



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RASTREIO VIROLÓGICO DE CÃES ERRANTES DA CIDADE DE VILA DO MAIO,
CABO VERDE

PEDRO JOAQUIM DE CARVALHO MENDES CASTANHEIRA

CONSTITUIÇÃO DO JURÍ

ORIENTADORA

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RASTREIO VIROLÓGICO DE CÃES ERRANTES DA CIDADE DE VILA DO MAIO,
CABO VERDE

PEDRO JOAQUIM DE CARVALHO MENDES CASTANHEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JURÍ

ORIENTADORA

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2012

LISBOA

Dedico este trabalho à minha Família

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Duarte, pela sua simpatia, disponibilidade, atenção e paciência.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), pela disponibilização dos meios materiais e financeiros necessários para a realização deste trabalho.

Aos Veterinários Sem Fronteiras, pela colheita de amostras e fornecimento de registos dos animais provenientes de Cabo Verde.

À Doutora Margarida Duarte e à Fátima Cordeiro, pela ajuda e disponibilidade, e ao Laboratório Nacional de Investigação Veterinária.

À Professora Doutora Isabel Neto, pelo auxílio na parte estatística deste trabalho.

Aos meus amigos, que me acompanharam ao longo destes seis anos.

Aos meus pais e aos meus irmãos por me apoiarem sempre.

RASTREIO VIROLÓGICO DE CÃES ERRANTES DA CIDADE DE VILA DO MAIO, CABO VERDE

As infecções pelo parvovírus canino (CPV), vírus da esgana canina (CDV) e coronavírus canino (CCoV) são importantes causas de morbidade e de mortalidade em cães de todo o mundo. Contudo, aparentemente não se conhece a sua incidência e prevalência no arquipélago de Cabo Verde. Para determinar a prevalência dessas infecções na população canina da cidade de Vila do Maio, situada na ilha do Maio, foram colhidas amostras a partir cães errantes desse local em dois períodos distintos: no ano de 2010 obtiveram-se 53 zaragatoas retais e em 2011 colheram-se 93 zaragatoas retais e 88 amostras de sangue, existindo 56 animais coincidentes nos dois tipos de amostra. Do total de 125 cães amostrados neste último ano apenas 2 eram vacinados. Testou-se a presença de ácido nucleico viral por *real-time* PCR e *real-time* RT-PCR a partir das zaragatoas e analisou-se a presença de anticorpos contra CPV e CDV nas amostras de sangue.

Em relação a 2010, detetou-se ácido nucleico viral em 43,3% (23/53) das amostras para CPV, 11,3% (6/53) para CDV e 1,9% (1/53) para CCoV. Em 2011, a prevalência de CPV foi de 44,1% (41/93), 0% para CDV e 1,1% (1/93) para CCoV. Ainda neste ano, anticorpos contra o CPV foram detetados em 71,6% (63/88) das amostras de sangue e a seroprevalência no caso do CDV foi de 51,1% (45/88). A presença de anticorpos anti-CPV foi significativamente superior nos cães mais velhos e observou-se uma tendência crescente de seropositividade com o aumento da idade no caso do CDV, embora não fosse estatisticamente significativo. Não se registaram diferenças de seroprevalência em relação ao género dos animais.

Este trabalho demonstra a importância da vigilância epidemiológica molecular em populações de animais errantes e domésticos das cidades, uma vez que o seu elevado número possibilita a disseminação e manutenção dos vírus nestes locais, que pode conduzir a uma elevada mortalidade em populações com reduzidas taxas de vacinação. Para além disso, estes animais podem constituir reservatórios das doenças, havendo possibilidade de transmissão às populações de animais selvagens através de contactos ocasionais. Seria importante identificar a fauna silvestre suscetível da ilha do Maio, para se avaliar até que ponto os vírus que se encontram em Vila do Maio podem constituir um perigo para esses animais.

Palavras-chave: rastreio virológico, epidemiologia molecular, parvovírus canino, vírus da esgana canina, coronavírus canino, Cabo Verde

VIROLOGICAL SURVEY IN STRAY DOGS OF VILA DO MAIO, CAPE VERDE

Infections caused by canine parvovirus (CPV), canine distemper virus (CDV) and canine coronavirus (CCoV) are important causes of morbidity and mortality in dogs worldwide. However, it seems that the incidence and prevalence of these viruses is unknown in the archipelago of Cape Verde. To determine the prevalence of these infections in Vila do Maio canine population, located in Maio island, samples were collected from stray dogs in two distinct periods: in 2010, fifty three rectal swabs were obtained and in 2011 a total of 93 rectal swabs and 88 blood samples were collected, and 56 animals were coincident in both sample types. Out of the 125 dogs sampled in the latter year, only 2 were vaccinated. We tested the presence of viral nucleic acid by *real-time* PCR and *real-time* RT-PCR from rectal swabs and analyzed the presence of CDV and CPV antibodies in blood samples.

From the 2010 sampling, viral nucleic acid was detected in 43,3% (23/53) samples for CPV, 11,3% (6/53) for CDV and 1,9% (1/53) for CCoV. In 2011, the prevalence of CPV was 44,1% (41/93), 0% for CDV and 1,1% (1/93) for CCoV. In this year, antibodies against CPV were detected in 71,6% (63/88) of blood samples and the seroprevalence for CDV was 51,1% (45/88). The presence of anti-CPV antibodies was significantly higher in older dogs and a linear increase in seroprevalence with age was observed for CDV, although in this case this association was not statistically significant. There were no differences in seroprevalence between genders.

This study demonstrates the importance of molecular epidemiological surveillance in urban populations of stray and domestic animals, since their high density enables the transmission and spread of the viruses in these locations, which can lead to high mortality in animal populations with low vaccination rates. In addition, these animals can be reservoirs of diseases, with the possibility of transmission to wild animal populations by occasional contact. It would be important to identify the wildlife of Maio island, to evaluate to which extent the viruses circulating in Vila do Maio can pose a threat to these animals.

Key words: virological survey, molecular epidemiology, canine parvovirus, canine distemper virus, canine coronavirus, Cape Verde

1. Introdução.....	1
1.1 Atividade laboratorial.....	2
1.2 Estudo desenvolvido	2
1.3 Objetivos	2
2. Revisão bibliográfica	3
2.1 Parvovírus canino	3
2.1.1 Taxonomia.....	3
2.1.2 Estrutura molecular	3
2.1.3 História evolutiva	4
2.1.4 Epidemiologia.....	6
2.1.5 Patogénese	6
2.1.6 Quadro clínico	7
2.1.7 Diagnóstico.....	7
2.1.8 Vacinação	8
2.2 Vírus da esgana canina.....	9
2.2.1 Taxonomia.....	9
2.2.2 Estrutura molecular	9
2.2.3 História evolutiva	11
2.2.4 Epidemiologia.....	11
2.2.5 Patogénese	12
2.2.6 Quadro clínico	13
2.2.7 Diagnóstico.....	13
2.2.8 Vacinação	14
2.3 Coronavírus canino	14
2.3.1 Taxonomia.....	14
2.3.2 Estrutura molecular	15
2.3.3 História evolutiva	16
2.3.4 Epidemiologia.....	18
2.3.5 Patogénese	18
2.3.6 Quadro clínico	19
2.3.7 Diagnóstico.....	19
2.3.8 Vacinação	20
3. Material e métodos	21
3.1 População estudada e recolha de amostras.....	21
3.2 Processamento de amostras.....	22
3.3 Extração de ácidos nucleicos	22

3.4 Detecção de ácidos nucleicos através de <i>real-time</i> PCR e <i>real-time</i> RT-PCR	22
3.5 Detecção de anticorpos	24
3.6 Análise estatística	25
4. Resultados	26
4.1 Registos fornecidos pelos VSF	26
4.2 Aferição da sensibilidade do <i>real-time</i> PCR e <i>real-time</i> RT-PCR.....	26
4.3 CPV – <i>real-time</i> PCR e ELISA.....	27
4.4 CDV – <i>real-time</i> RT-PCR e ELISA	29
4.5 CCoV – <i>real-time</i> RT-PCR e ELISA	30
5. Discussão	32
5.1 CPV	32
5.2 CDV	35
5.3 CCoV	37
5.4 Agentes patogénicos e conservação da vida selvagem.....	39
6. Conclusão	45
Bibliografia	46

Lista de figuras

Figura 1 – Estrutura molecular (a) e genoma (b) do parvovírus canino	4
Figura 2 – Estrutura do vírus da esgana canina (a) e o seu genoma (b)	10
Figura 3 – Estrutura molecular (a) e genoma dos coronavírus (b).....	16
Figura 4 – Arquipélago de Cabo Verde. Local de colheita de amostras assinalado com um círculo (Vila do Maio – Ilha do Maio)	21
Figura 5 – Curvas de amplificação das diluições do controlo positivo do CPV (Original).....	27
Figura 6 – Curvas de amplificação de amostras positivas e negativas ao CPV e respetivos controlos positivos e negativos (original).....	27
Figura 7 – Curvas de amplificação de amostras positivas e negativas ao CDV e respetivos controlos positivos e negativos (original).....	29
Figura 8 – Curvas de amplificação da amostra positiva e das amostras negativas ao CCoV e respetivos controlos positivos e negativos (original).....	31

Lista de tabelas

Tabela 1 – Morbilivírus e respetivo espectro de hospedeiros.....	9
Tabela 2 – Número de amostras colhidas em cada ano	21
Tabela 3 – Primers e sondas utilizados no <i>real-time</i> PCR e <i>real-time</i> RT-PCR para amplificação das sequências dos diferentes vírus, sua localização e dimensão dos fragmentos obtidos	23
Tabela 4 – Concentrações dos primers e sondas utilizadas no <i>real-time</i> PCR para os diferentes vírus	23
Tabela 5 – Ciclos térmicos utilizados no <i>real-time</i> PCR para os diferentes vírus	24
Tabela 6 – Detalhe dos registos relativos às amostras de 2011.....	26
Tabela 7 – Distribuição dos resultados laboratoriais de acordo com o ano	31

Lista de gráficos

Gráfico 1 – Distribuição dos títulos de anticorpos das amostras seropositivas ao CPV.....	28
Gráfico 2 – Proporção de animais seropositivos ao CPV de acordo com a idade	28
Gráfico 3 – Distribuição das absorvâncias relativas às amostras positivas ao CDV e legenda das classes de títulos de anticorpos	30
Gráfico 4 – Percentagem de animais seropositivos ao CDV de acordo com a idade	30

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

°C – Graus Celsius

µl – Microlitro

µM – Micromolar

χ^2 – Qui-Quadrado

Asn – Asparagina

Asp – Aspartato

bp – *Base pairs* (pares de bases)

CCoV – *Canine coronavirus* (coronavírus canino)

CDV – *Canine distemper virus* (vírus da esgana canina)

CRCoV – *Canine respiratory coronavirus* (coronavírus respiratório canino)

CPV – *Canine parvovirus* (parvovírus canino)

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilenodiaminotetracético)

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático)

FCoV – *Feline coronavirus* (coronavírus felino)

FPV – *Feline panleucopenia virus* (vírus da panleucopénia felina)

g – Grama

xg – Força centrífuga

Glu – Glutamato

Ile – Isoleucina

kb – *Kilobase* (quilobase)

MEV – *Mink enteritis virus* (vírus da enterite dos visons)

mRNA – *Messenger ribonucleic acid* (ácido ribonucleico mensageiro)

ng – Nanograma

nm – Nanómetro

PBS – *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato salino)

ORF – *Open reading frame* (grelha de leitura aberta)

PCR – *Polymerase chain reaction* (reacção em cadeia da polimerase)

RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

RPV – *Raccoon parvovirus* (parvovírus do guaxinim)

RT-PCR – *Reverse transcription-PCR* (PCR com transcrição reversa)

TfR – *Transferrin receptor* (recetor de transferrina)

TGEV – *Transmissible gastroenteritis virus* (vírus da gastroenterite transmissível)

Val – Valina

VVM – Vacina viva modificada

1. Introdução

O presente trabalho, efetuado no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, foi realizado no Laboratório de Virologia e de Biologia Molecular (CIISA), da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Técnica de Lisboa (UTL), sob a orientação da Professora Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte. O estágio realizado consistiu num período de 4 meses, entre setembro e dezembro de 2011, durante o qual se efetuou um rastreio virológico em amostras de canídeos errantes provenientes de Cabo Verde, utilizando-se para o efeito técnicas moleculares e serológicas de diagnóstico.

1.1 Atividade laboratorial

Durante o estágio, tive a oportunidade de conhecer métodos usados no diagnóstico virológico de diversas doenças animais e contactar com outras técnicas laboratoriais. O CIISA possui equipamentos que são utilizados para diversos fins, incluindo projetos de investigação em várias áreas e também o diagnóstico a partir de amostras provenientes do Hospital Escolar da FMV e de outras clínicas.

Para a realização do rastreio em causa, duas das técnicas utilizadas foram o *real-time polymerase chain reaction* (*real-time* PCR) e o *real-time reverse transcription polymerase chain reaction* (*real-time* RT-PCR), que consistem em métodos de deteção, amplificação e quantificação de ácidos nucleicos (DNA e RNA, respetivamente) altamente sensíveis e específicos. Por sua vez, o diagnóstico serológico foi efetuado no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), utilizando-se o método de ELISA indireta (*indirect enzyme-linked immunosorbent assay*) que deteta e quantifica anticorpos presentes no plasma. No caso do *real-time* PCR e do *real-time* RT-PCR as amostras utilizadas corresponderam a zaragatoas retais, às quais se extraíram os ácidos nucleicos virais eventualmente aí presentes, com *kits* específicos. Para a ELISA, o material biológico consistiu no sangue dos animais, sendo este previamente centrifugado para obtenção do plasma, o qual foi utilizado neste ensaio. Durante este estágio, produziu-se ainda um recombinante plasmídico de CDV, o qual foi posteriormente utilizado como controlo positivo no *real-time* RT-PCR. Auxiliei também a Professora Ana Duarte na realização de outros projetos, nomeadamente no rastreio virológico de carnívoros errantes da região de Valongo, enquadrado numa das ações de controle de populações errantes dos Veterinários Sem Fronteiras (VSF) em Portugal Continental, assim como no diagnóstico virológico de amostras provenientes do Hospital Escolar, em que pude efetuar a técnica de PCR convencional. Contrariamente ao *real-time* PCR, este método não é quantitativo e exige a realização de um gel de agarose para evidenciação dos produtos amplificados.

1.2 Estudo desenvolvido

Ao longo dos últimos anos, verificou-se que cada vez mais são publicados artigos científicos referentes a rastreios virológicos nas populações animais. Para além do desenvolvimento e criação de novos métodos de diagnóstico terem contribuído para este facto, face à constante alteração e mutação que os vírus sofrem, torna-se necessário aprofundar a investigação neste sentido. O aparecimento de novas variantes virais significa não só um perigo para os animais domésticos, mas também para a fauna silvestre. O elevado número e densidade de animais domésticos e errantes que existe nos meios urbanos permite a disseminação e manutenção dos vírus nestas populações. Consequentemente, estes animais podem constituir reservatórios das doenças, havendo possibilidade de transmissão às populações de animais silvestres através de contactos ocasionais.

Para realização deste estudo, foram colhidas amostras de cães errantes oriundos de Cabo Verde. Esta recolha foi efetuada no âmbito de uma ação desenvolvida pelos VSF, que teve como objetivo a castração dos animais e vigilância sanitária do local. Esta atividade realizou-se em dois períodos distintos: uma no ano de 2010, que envolveu um total de 53 animais e outra no ano de 2011 que compreendeu 125 cães. As duas amostragens foram realizadas em cães da cidade de Vila do Maio (mais conhecida localmente como Porto Inglês) situada na ilha de Maio, tendo sido recolhidas no verão (junho). Para os animais de 2011, foi registada informação relativa à sua idade, género e estado geral.

1.3 Objetivos

Na pesquisa bibliográfica efetuada para a execução deste trabalho, constatou-se que os rastreios virológicos se realizam por todo o mundo e englobam a deteção e análise de uma elevada diversidade de vírus. No arquipélago de Cabo Verde, este tipo de estudo não foi ainda desenvolvido. Com o objetivo de detetar a possível presença de vírus caninos e conhecer a sua distribuição na ilha do Maio, as amostras recolhidas a partir de cães errantes da cidade de Vila do Maio foram testadas para três vírus diferentes: parvovírus canino (CPV), vírus da esgana canina (CDV) e coronavírus canino (CCoV), de forma a estimar a prevalência viral nesta população de animais e averiguar o papel destes cães na manutenção e potencial disseminação destes agentes patogénicos, tanto nas populações de animais domésticos como nas populações de animais selvagens.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Parvovírus canino

2.1.1 Taxonomia

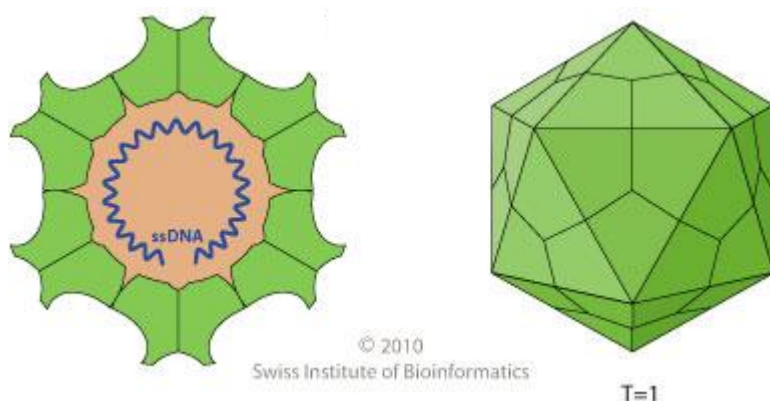
A família *Parvoviridae* engloba duas subfamílias. Os vírus que afetam vertebrados estão incluídos na subfamília *Parvovirinae*, enquanto que a subfamília *Densovirinae* contém os vírus que afetam insetos. Existem atualmente cinco gêneros dentro da subfamília *Parvovirinae*: *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* e *Bocavirus*. O parvovírus canino (CPV) pertence ao gênero *Parvovirus* e inclui-se na espécie *Feline panleukopenia virus* juntamente com o vírus da panleucopénia felina (FPV), o vírus da enterite dos visons (*mink enteritis virus* – MEV) e o parvovírus do guaxinim (*raccoon parvovirus* - RPV) (Tattersall et al., 2005). Presume-se que o CPV terá surgido a partir do vírus da panleucopénia felina ou de um parvovírus de carnívoros selvagens, através de mutações genéticas, tornando-se rapidamente num vírus com elevada patogenicidade para os cães. Este novo vírus foi denominado parvovírus canino do tipo 2 (CPV-2), para se distinguir do *minute virus of canines*, anteriormente conhecido como parvovírus canino do tipo 1 (CPV-1), que se inclui atualmente no gênero *Bocavirus*. O CPV-1, isolado pela primeira vez em 1967 (Binn, Lazar, Eddy & Kajima, 1970), não possui relação genética e antigénica com o CPV-2 (Carmichael, Schlafer & Hashimoto, 1994).

2.1.2 Estrutura molecular

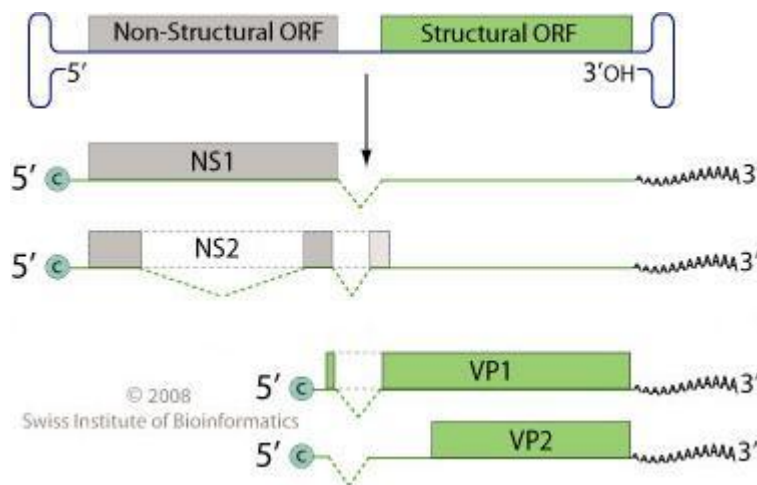
Os parvovírus são vírus pequenos e sem envelope que possuem uma cápside esférica com cerca de 25nm de diâmetro no interior da qual se encontra o seu genoma (ver Figura 1-a). Este genoma consiste numa molécula simples linear de DNA com cerca de 5 kb que contém duas grelhas de leitura aberta (ORF) (ver Figura 1-b). A ORF que se encontra na extremidade 3' codifica duas proteínas não estruturais, a NS1 e a NS2, enquanto que a ORF localizada na extremidade 5' codifica duas proteínas estruturais, a VP1 e a VP2, através de *splicing* alternativo dos mesmos mRNAs (Reed, Jones & Miller, 1988). A cápside é formada por uma combinação de três proteínas: VP1, VP2 e VP3. As proteínas VP1 e VP2 constituem a maior parte da cápside viral, formada por 60 capsómeros correspondentes a 10 cópias da VP1 e a 50 cópias da VP2. A proteína VP2 corresponde à região N-terminal truncada da proteína VP1. A terceira proteína, denominada VP3, é produzida pela clivagem enzimática de 18 a 20 aminoácidos da porção N-terminal da VP2 e só se encontra nos viriões infecciosos (Park et al., 2007). A estrutura da cápside compreende três regiões separadas que por sua vez definem 3 eixos de simetria, determinantes para a variabilidade de espécies que o CPV consegue infetar, uma vez que permitem ao vírus ligar-se a diferentes recetores de transferrina (TfR) da célula hospedeira (Hueffer & Parrish, 2003).

Figura 1 – Estrutura molecular (a) e genoma (b) do parvovírus canino (adaptado de <http://www.expasy.ch/viralzone>).

(a)



(b)



2.1.3 História evolutiva

O CPV-2 foi isolado pela primeira vez em 1978. Este vírus provocava uma doença entérica e miocárdica e afetava exclusivamente os cães (Appel, Scott & Carmichael, 1979). A doença era associada a uma elevada mortalidade e em poucos meses este vírus foi detetado em todo o mundo. (Parrish, 1999). O CPV-2 terá surgido possivelmente como uma variante do vírus da panleucopénia felina (FPV). Ao longo dos anos, foram colocadas várias hipóteses para o aparecimento deste novo vírus. Uma das hipóteses consiste numa mutação direta do FPV, de forma semelhante ao processo que conduziu ao surgimento do MEV em 1940. Outra das hipóteses sugere que o CPV-2 emergiu de um FPV vacinal após propagação em cultura de tecidos e que foi inicialmente disseminado através da vacinação. Esta hipótese explica o aparecimento quase simultâneo deste vírus nas populações de cães de todo o mundo. Uma terceira hipótese aponta para o aparecimento de um intermediário entre o FPV e o CPV, que se poderá ter alojado num carnívoro selvagem diferente do cão e do gato

(Truyen, 1999). A análise filogenética de vários vírus semelhantes ao FPV recolhidos entre os anos 60 e 80 evidenciou uma estirpe viral proveniente de uma raposa do ártico da Finlândia, revelando uma elevada proximidade com o CPV (Truyen et al., 1995). Também na Alemanha foram encontradas raposas vermelhas onde se detetaram sequências de DNA intermediárias entre o FPV e o CPV (Truyen, Müller, Heidrich, Tackmann & Carmichael, 1998).

A capacidade de infeção e a variabilidade de hospedeiros que o CPV e o FPV conseguem infectar é controlada pela interação entre a sua cápside e os TfR das células-alvo. A ligação dos viriões aos recetores celulares corresponde a um passo crucial no seu ciclo de infeção, determinando a suscetibilidade de hospedeiros e o tropismo tecidual dos vírus (Palermo, Hafenstein & Parrish, 2006). As sequências nucleotídicas do CPV e do FPV diferem em 0,5%, e as propriedades características do CPV-2 são controladas por um pequeno número de alterações ao nível da superfície da cápside viral. São estas diferenças que determinam o espectro de hospedeiros que estes vírus conseguem infectar (Hueffer et al., 2003). Existem pelo menos seis ou sete alterações amino-acídicas entre o FPV e o CPV-2, principalmente localizadas na proteína VP2, que interferem com a ligação dos vírus ao TfR das células-alvo hospedeiras. Estas alterações podem ter contribuído para o aumento de afinidade para o TfR canino, observado durante a transição do FPV ou de um vírus intermediário para o CPV-2 (Shackleton, Parrish, Truyen & Holmes, 2005).

Apesar de possuir um genoma DNA, o CPV-2 possui uma taxa de mutação genética elevada, semelhante à observada nos vírus com genoma RNA, a qual é responsável pela evolução antigénica contínua e pelo aparecimento de novas variantes antigénicas (Decaro et al., 2007a). Pouco tempo após a sua primeira deteção no final dos anos 70, o CPV-2 foi substituído por duas variantes antigénicas, CPV-2a e CPV-2b, distinguíveis através da utilização de anticorpos monoclonais, que se disseminaram rapidamente por todo o mundo (Parrish et al., 1985, 1991). O CPV-2a surgiu em 1979 e substituiu globalmente o CPV-2 em aproximadamente dois a três anos (Parrish et al., 1988), enquanto que o CPV-2b emergiu por volta do ano 1984. Estas variantes diferem da estirpe original CPV-2 em cinco ou seis resíduos amino-acídicos da proteína VP2 da cápside. Contrariamente, as diferenças antigénicas entre o CPV-2a e o CPV-2b resultam de apenas duas substituições aminoacídicas (resíduo 426 Asn → Asp e resíduo 555 Ile → Val) (Martella, Decaro & Buonavoglia, 2006). Verificou-se também que ambas as variantes possuem um espectro de hospedeiros mais alargado comparativamente ao CPV-2, visto que têm a capacidade de infectar células caninas e células felinas *in vitro* assim como cães e gatos *in vivo* (Decaro et al., 2007c). Atualmente, estas variantes substituíram o CPV-2 original, o qual é ainda utilizado na maioria das vacinas comerciais (McElligott et al., 2011), distribuídas pelas populações caninas em todo o mundo. No ano 2000, uma nova variante com uma alteração aminoacídica no resíduo 426 (Asp → Glu), foi detetada em Itália (Buonavoglia et al., 2001) e

foi designada CPV-2c (Decaro et al., 2006). Vários estudos demonstraram que este novo biótipo predomina em vários países da Europa como Itália, Alemanha e Espanha e também se encontra largamente distribuído em Portugal, França e Bélgica (Decaro et al., 2007a; Vieira et al., 2008; Decaro et al., 2011). No Reino Unido, Grécia e Bulgária o CPV-2c foi encontrado esporadicamente, havendo uma maior frequência das variantes CPV-2a e CPV-2b (Decaro et al., 2007a; Ntafis et al., 2010; Filipov et al., 2011). Na Alemanha, o CPV-2c foi detetado em amostras armazenadas de 1996, confirmando a seu aparecimento 4 anos antes da primeira deteção em Itália (Decaro et al., 2007a). Fora da Europa, o CPV-2c também foi detetado na Tunísia (Touihri et al., 2009), Israel (Nivy et al., 2011), América do Norte (Hong et al., 2007; Kapil et al., 2007), América do Sul (Pérez et al., 2007; Calderón et al., 2009, 2011; Streck et al., 2009; Pinto et al., 2012), Índia (Nandi et al., 2010) e Vietname (Nakamura et al., 2004).

2.1.4 Epidemiologia

Os parvovírus são extremamente estáveis no ambiente, assumindo assim a transmissão indireta um papel fundamental na disseminação e manutenção dos vírus nas populações, especialmente nas de carnívoros selvagens, uma vez que nestas o contacto entre animais é reduzido (Hoelzer & Parrish, 2010). A maior parte das infeções ocorre devido ao contacto com fezes contaminadas no ambiente, por exposição fecal-oral (Patel & Heldens, 2009), mas também através de insetos, roedores e fomites, que permitem a transmissão do vírus a longas distâncias. A baixa dose de vírus necessária para o estabelecimento de uma infeção e a facilidade na transferência mecânica do vírus são fatores importantes para a disseminação da infeção. O CPV pode afetar animais de qualquer idade, raça ou sexo, mas os cachorros com idades entre as 6 semanas e os 6 meses parecem ser mais suscetíveis (Goddard & Leisewitz, 2010). A excreção fecal do vírus inicia-se 3 dias após infeção e pode prolongar-se até 3 a 4 semanas após doença clínica ou subclínica (Goddard & Leisewitz, 2010).

Todos os parvovirus são altamente estáveis no ambiente, uma vez que são extremamente resistentes a alterações do pH e da temperatura assim como a tratamentos com solventes lipídicos, tripsina e à maioria dos desinfetantes. Os viriões podem ser inativados pela formalina, hipoclorito de sódio, beta propiolactona, hidroxilamina, agentes oxidantes e radiação ultravioleta (Muzyczka and Berns, 2001).

2.1.5 Patogénese

O CPV pode difundir-se a todos os tecidos, mas a replicação deste vírus requer células com índices mitóticos elevados, como por exemplo as células das criptas intestinais, dos órgãos linfoides ou ainda de fetos ou recém nascidos. Após entrada pela via oronasal, o vírus replica-se no tecido linfoide associado ao tubo digestivo, disseminando-se em seguida para

a corrente sanguínea. A partir daí, invade rapidamente os tecidos-alvo referidos anteriormente. Esta infecção é acompanhada de linfopénia, muitas vezes associada a neutropénia. Três dias após infecção, as células das criptas intestinais encontram-se infetadas e a replicação do vírus provoca colapso das vilosidades intestinais, necrose epitelial e diarreia hemorrágica. Estudos demonstraram que em comparação com o CPV-2 original, as variantes antigénicas CPV-2a e CPV-2b são excretadas pelas fezes em títulos muito mais elevados (Desario et al., 2005). Para além disso, verificou-se também que era necessária uma menor quantidade de vírus para ocorrer uma infecção eficaz.

2.1.6 Quadro clínico

As manifestações clínicas da parvovirose variam com a idade, stress, raça e estado imunitário do animal. A doença clínica pode ser desencadeada pelo stress e pode ser exacerbada pela presença de infeções concomitantes de agentes entéricos oportunistas (bactérias e parasitas). Os períodos de incubação podem variar entre 7 a 14 dias para o CPV-2 e no caso das variantes este período é mais curto, variando entre 4 e 6 dias (McCaw & Hoskins, 2006). Os sinais clínicos consistem em anorexia, depressão, vômito e diarreia mucoide ou sanguinolenta, frequentemente desidratação e febre. Em cães seronegativos com duas a três semanas de idade, o CPV também tem a capacidade de se replicar nas células cardíacas, induzindo uma miocardite fatal. Contudo, esta forma de infecção é cada vez menos comum, uma vez que a maioria dos cães recém-nascidos estão protegidos por anticorpos maternos provenientes de cadelas vacinadas (Patel & Heldens, 2009). Infeções subclínicas e inaparentes são frequentemente detetadas, principalmente em cachorros com títulos de anticorpos maternos intermédios e em cães adultos. As taxas de mortalidade podem atingir 70% em cachorros, mas são geralmente inferiores a 1% em cães adultos.

2.1.7 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da parvovirose nem sempre é fácil de realizar, dado que vários agentes patogénicos podem provocar um quadro clínico semelhante àquele manifestado nesta doença. Assim, torna-se necessário recorrer a testes laboratoriais para confirmação da infecção. Diversos métodos têm sido desenvolvidos com vista ao diagnóstico laboratorial da infecção pelo CPV-2, os quais utilizam principalmente as fezes (ou o conteúdo intestinal, caso o animal esteja morto) como material biológico. Alguns testes utilizados na prática veterinária, baseados na deteção de antígenos através de anticorpos, são utilizados na deteção deste vírus, como por exemplo ELISA e imunocromatografia. No entanto, estes testes apresentam baixa sensibilidade, comparativamente aos métodos moleculares (Desario et al., 2005). Existem ainda os testes de hemaglutinação e isolamento viral que apenas podem ser efetuados em laboratórios especializados para além de que foi demonstrado que algumas estirpes do CPV-2 não possuem atividade hemaglutinante

(Cavalli et al., 2001; Desario et al., 2005). Para além disso, o isolamento viral exige técnicos especializados e períodos de tempo muito extensos para um teste diagnóstico de rotina. Contrariamente aos testes tradicionais referidos anteriormente, os métodos moleculares baseados na deteção de ácidos nucleicos por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) convencional ou *real-time* PCR possuem uma elevada sensibilidade e especificidade, detetando e quantificando DNA em pequenas quantidades de amostra (Desario et al., 2005). A elevada sensibilidade e reprodutibilidade do *real-time* PCR permite a identificação de cães que se encontrem a excretar o CPV em títulos baixos, possibilitando a implementação de medidas de profilaxia com o objetivo de prevenir a infeção pelo CPV, especialmente em canis onde este vírus é frequentemente responsável por epizootias severas (Decaro et al., 2005a).

2.1.8 Vacinação

A profilaxia da infeção por CPV depende essencialmente da vacinação. Recomenda-se a utilização de vacinas vivas modificadas (VVM), devido à sua maior capacidade de induzir imunidade e de uma forma mais rápida comparativamente às vacinas inativadas. As VVM, fabricadas a partir do vírus original CPV-2 ou da sua variante CPV-2b, são altamente eficazes, sendo capazes de proteger os cães contra a doença assim como contra a infeção. Podem ocorrer falhas na vacinação, principalmente quando existe interferência entre os anticorpos maternos transmitidos através do colostro e a imunização ativa (Goddard & Leisewitz, 2010). Para se evitar esta situação, a vacinação das ninhadas apenas deve ser realizada após a depleção dos anticorpos maternos.

No entanto, o aparecimento recente das novas variantes do CPV-2 tem despoletado opiniões bastante divergentes relativamente à proteção e eficácia das vacinas fabricadas a partir do CPV-2. Muitos autores sugerem que as vacinas baseadas na estirpe original ainda permitem a proteção contra as variantes atualmente em circulação (Spibey et al., 2008; Siedek et al., 2011). Por outro lado, outros investigadores indicam que a imunidade induzida por esta vacina apresenta uma eficácia muito menor na proteção contra as novas variantes (Pratelli et al., 2001a; Cavalli et al., 2008; Decaro et al., 2008). Face à suspeita de que as diferenças antigénicas entre a estirpe original CPV-2 e os subtipos CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c podem conduzir a um decréscimo da eficácia da vacina, tem sido sugerida a preparação e distribuição de vacinas baseadas nestas variantes (Pratelli et al., 2001a; Cavalli et al., 2008; Decaro et al., 2008; Calderón et al., 2009; Patel & Heldens, 2009; Ntafis et al., 2010). Colocou-se também em causa a eficácia das vacinas produzidas a partir do FPV na proteção dos gatos, já que o espetro de hospedeiros das variantes do CPV inclui estes animais. Apesar de já terem sido realizados alguns estudos em relação à eficácia destas vacinas contra as variantes antigénicas do CPV-2 (Gamoh et al., 2005), será necessária uma investigação mais aprofundada. Contudo, seria importante considerar a produção de

vacinas multivalentes contendo uma combinação do FPV e de uma variante do CPV (Decaro et al., 2010a).

2.2 Vírus da esgana canina

2.2.1 Taxonomia

A esgana canina é uma doença viral altamente contagiosa, responsável por elevadas taxas de mortalidade em cães em todo o mundo (Frisk, König, Moritz & Baumgartner, 1999; Martella et al., 2007). A doença é provocada pelo vírus da esgana canina (CDV), que pertence ao género *Morbilivirus* da família *Paramyxoviridae* que inclui outros vírus patogénicos (ver Tabela 1).

Tabela 1 – Morbilivírus e respetivo espetro de hospedeiros (adaptado de Green & Appel, 2006)

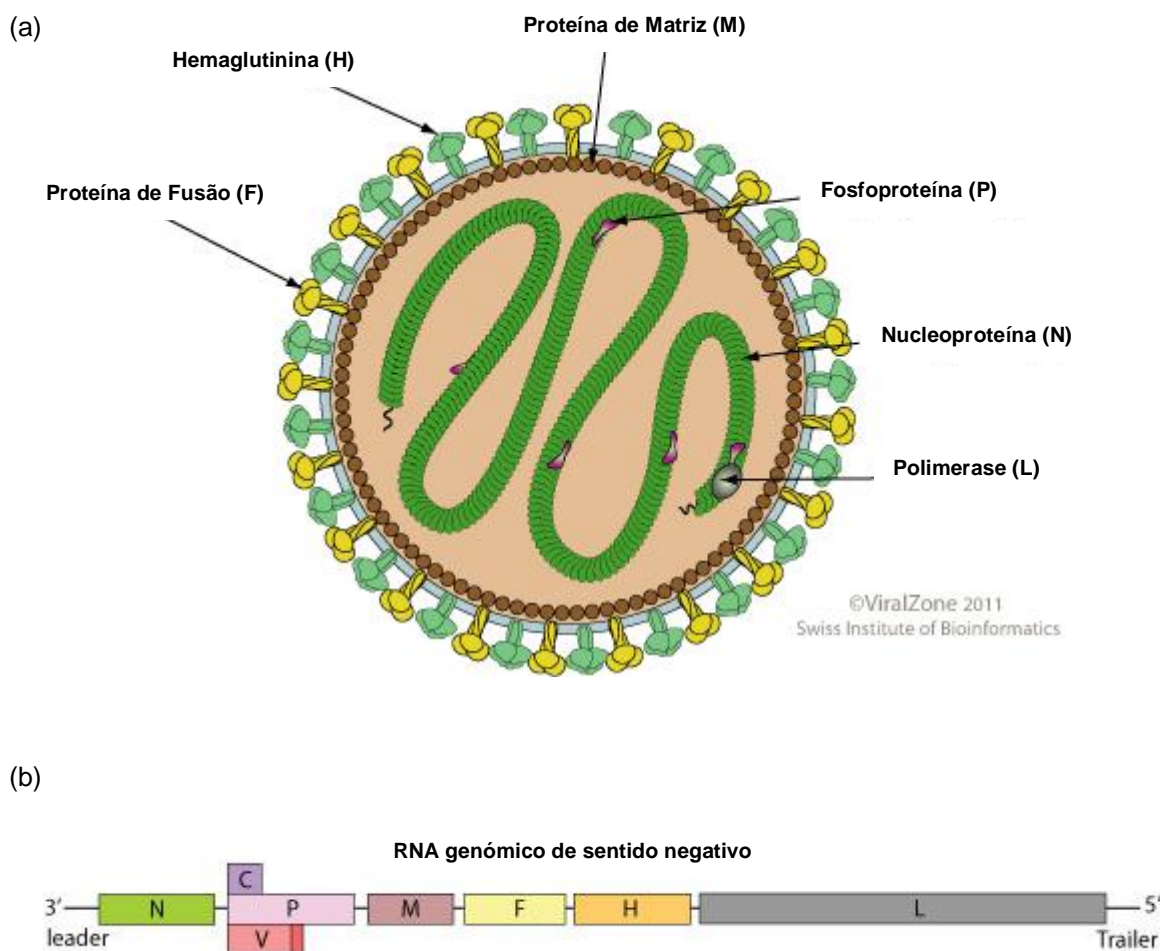
Morbilivírus	Hospedeiros naturais
Sarampo (<i>Measles virus</i> - MV)	Homem e primatas não-humanos
Peste dos ruminantes (<i>Rinderpest virus</i> - RPV)	Domésticos: Vaca, porco, cabra e ovelha Selvagens: Búfalo, girafa, cudo, javali, gnu, antílope indiano
Peste dos pequenos ruminantes (<i>Peste des petits ruminants</i> - PPRV)	Domésticos: Cabra e ovelha Selvagens: Gazela, cabra-dos-alpes, órix
Vírus da esgana das focas (<i>Phocine distemper virus</i> - PDV)	Foca
Esgana canina (<i>Canine distemper virus</i> - CDV)	Foca (anteriormente denominado PDV-2) e membros das famílias Canidae, Mustelidae, Procyonidae, Felidae, Suidae.
Morbilivírus dos cetáceos (<i>Cetacean morbilivirus</i> - CeMV)	Cetáceos
Morbilivírus equino (<i>Equine morbilivirus</i> – EMV)	Domésticos: Cavalo, Homem. Selvagem: Morcego (género <i>Pteropus</i>)
Morbilivírus porcino (<i>Porcine morbilivirus</i>)	Domésticos: Porco, Homem. Selvagem: Morcego (género <i>Pteropus</i>)

2.2.2 Estrutura Molecular

O genoma do CDV consiste numa molécula de RNA simples linear de sentido negativo, constituído por cerca de 15 kb e compreende seis genes que codificam proteínas estruturais (von Messling et al., 2001) e enzimáticas (ver Figura 2-b). Este genoma está encerrado numa nucleocápside helicoidal, que por sua vez se encontra contida num invólucro lipídico com um diâmetro compreendido entre 150 a 300 nm (Pardo et al., 2005), proveniente da membrana celular da célula hospedeira (ver Figura 2-a). Este invólucro é constituído por uma proteína de matriz (M) e duas glicoproteínas de superfície: a proteína hemaglutinina (H) e a proteína de fusão (F). A proteína H assegura a ligação do virião à membrana celular e a

proteína F promove a fusão do virião com a membrana citoplasmática da célula hospedeira (von Messling et al., 2001). Por sua vez, a proteína M é responsável pela união entre a nucleocápside e as glicoproteínas H e F durante a maturação viral (Beineke et al., 2009). A proteína da nucleocápside (nucleoproteína) (N) encapsula e protege o RNA e está associada a outras duas proteínas virais: a proteína polimerase (L) e a fosfoproteína (P), que participam na transcrição e replicação viral (Barrett, 1999). O gene da fosfoproteína corresponde a uma região altamente conservada do genoma viral que codifica o cofator da polimerase e duas proteínas não-estruturais: a proteína V que contraria os mecanismos de imunidade da célula hospedeira (von Messling et al., 2006), e a proteína C cuja função é ainda desconhecida.

Figura 2 – Estrutura do vírus da esgana canina (a) e o seu genoma (b) (retirado de <http://www.expasy.ch/viralzone>)



N – proteína da nucleocápside; P – fosfoproteína; C, V – proteínas não-estruturais; M – proteína de matriz; F – proteína de fusão; H – proteína hemaglutinina; L – proteína polimerase.

2.2.3 História evolutiva

A esgana canina foi reconhecida há pelo menos 250 anos. O primeiro relato de infecção pelo CDV provém da América do Sul, descrito por Ulloa em 1746. Heusinger acreditava que o CDV tinha sido introduzido em Espanha a partir do Peru em 1760, difundindo-se a partir daí a outras partes da Europa e Rússia em poucos anos. A disseminação da epidemia inicia-se então por volta do ano 1760, mas é possível que a doença tenha aparecido antes e tenha sido confundida com a raiva. Em 1815, Jenner verificou que a esgana nos cães apresentava uma contagiosidade semelhante àquela observada na varíola, sarampo e escarlatina nos humanos. Em 1844, Karle efetuou uma infecção experimental, esfregando excreções respiratórias de cães doentes nos lábios de cães jovens. A etiologia da esgana permaneceu controversa até 1905, quando Henri Carré demonstrou que a esgana era provocada por um vírus filtrável (Blancou, 2004).

A análise de sequências de estirpes do CDV identificadas em diversas áreas geográficas e provenientes de várias espécies animais, demonstraram que o gene/glicoproteína da hemaglutinina do CDV sofre um *drift* genético de acordo com a localização geográfica (Martella et al., 2007). Análises filogenéticas baseadas neste gene revelaram a existência de pelo menos nove linhagens em diferentes áreas geográficas: *America-1*, *America-2*, *Asia-1*, *Asia-2*, *Europe-1/South America 1*, *European wildlife*, *Arctic-like*, *South America 2* e *Southern Africa* (Woma et al., 2010; Panzera et al., 2012). Tal como o gene H, o gene P também tem sido utilizado para análises filogenéticas (Butina, Denikina & Belikov, 2010; Goller et al., 2010; Nikolin, Wibbelt, Michler, Wolf & East, 2011).

A infecção pelo CDV em animais selvagens é considerada atualmente um grave problema a nível global, sendo responsável pela morte de animais selvagens, alguns dos quais em vias de extinção. Por exemplo, um dos episódios mais conhecidos desta infecção ocorreu no Parque Nacional do Serengeti na Tanzânia em 1994, em que se verificou a morte de uma grande população de leões (Roelke-Parker et al., 1996). Na Califórnia, uma espécie de raposa (*Urocyon littoralis*) ficou ameaçada devido a uma epizootia por CDV (Timm et al., 2009). Desde 2006, a população de carnívoros selvagens da região alpina do nordeste de Itália tem sofrido um surto generalizado de CDV (Monne et al., 2011). No Japão, foi detetado o vírus em várias espécies de mamíferos selvagens perto da cidade de Tanabe (Kameo et al., 2012). Também na China se verificou um surto de CDV em macacos-rhesus (Sun et al., 2010).

2.2.4 Epidemiologia

O CDV é normalmente transmitido através de aerossóis ou por exposição a exsudados respiratórios; no entanto, a urina e outras secreções podem também conter o vírus (Deem, Spelman, Yates & Montali, 2000). A excreção viral inicia-se sete dias após infecção e pode durar até 60 a 90 dias. Cães infetados subcl clinicamente ou clinicamente podem transmitir o

CDV a cachorros, que constituem uma população suscetível de infecção, permitindo assim a manutenção do vírus. Para além disso, a infecção transplacentária pode também ocorrer. Embora a imunidade contra o CDV seja de longa duração, os cães devem ser vacinados periodicamente, caso contrário podem perder a proteção contra o vírus e ficar infetados após stress, imunossupressão ou contacto com animais doentes. Estima-se que 25 a 75% dos cães suscetíveis ficam infetados subclínicamente, mas eliminam o vírus do organismo sem demonstrarem sinais de doença. Cães com idades compreendidas entre 3 e 6 meses de idade apresentam maior prevalência para infecção espontânea pelo CDV, o que está relacionado com a perda de anticorpos maternos (Greene & Appel, 2006), enquanto que a maior parte dos cães adultos se encontra protegida por imunização vacinal (Martella, Elia & Buonavoglia, 2008). Contudo, em populações suscetíveis a doença afeta cães de todas as idades (Greene & Appel, 2006).

O CDV é suscetível à luz visível e à radiação ultravioleta e extremamente suscetível ao calor e à seca. É destruído a temperaturas superiores a 50°C em 30 minutos, mas em secreções e tecidos excisados o vírus pode sobreviver pelo menos uma hora a 37°C e três horas a 20°C. Em climas moderados, o CDV não persiste em canis se os cães infetados forem retirados. A temperaturas próximas do ponto de congelação (0 a 4°C), o vírus mantém-se no ambiente durante semanas. O CDV mantém-se viável a pH compreendido entre 4,5 e 9. Como possui um envelope lipídico, este vírus é suscetível ao éter e clorofórmio, solução de formalina diluída, fenol e desinfetante de amónio quaternário. Os procedimentos de desinfecção de rotina são geralmente eficazes na destruição do CDV em canis, clínicas ou ambientes hospitalares (Greene & Appel, 2006).

2.2.5 Patogénese

Tanto a patogénese como o quadro clínico da esgana dependem de fatores intrínsecos ao agente e animal hospedeiro. A patogénese do CDV em cães domésticos tem sido bem caracterizada e prevê-se que seja similar em espécies não-domésticas (Deem et al., 2000). Quando os cães são expostos a aerossóis ou a exsudados respiratórios contendo o CDV, o vírus entra pelas vias respiratórias e multiplica-se nos macrófagos locais. Depois, através destas células, dissemina-se para as tonsilas e linfonodos brônquicos, onde também ocorre replicação do vírus, 2 a 4 dias após infecção. Durante o 4º e 6º dia, o CDV dissemina-se pela corrente sanguínea a outras estruturas como o baço, linfonodos mesentéricos, células de Kupffer do fígado e lâmina própria do estômago e do intestino delgado, onde se multiplica. Esta extensa replicação do vírus é acompanhada por um aumento da temperatura corporal e leucopénia, 3 a 6 dias após infecção. Entre o 8º e 9º dia após infecção, caso os cães não desenvolvam uma resposta imunitária humoral e celular adequada, o CDV difunde-se e replica-se nas células epiteliais e nos tecidos do sistema nervoso central, provavelmente por via hematogénea. A partir do 14º dia, animais que possuem uma imunidade celular e um

título de anticorpos adequado, eliminam o vírus da maioria dos tecidos sem apresentarem sinais de doença (Greene & Appel, 2006).

2.2.6 Quadro clínico

Os sinais clínicos manifestados com maior frequência têm origem respiratória, gastrointestinal, dérmica e nervosa.

Inicialmente, o animal afetado apresenta febre que nem sempre é detetada, 3 a 6 dias após infecção. Febre difásica e mal-estar generalizado são muitas vezes associados a virémia (Deem et al., 2000). Outros sinais comuns incluem apatia, perda de apetite e infecção do trato respiratório superior. Pode também ser observada uma descarga oculonasal serosa e bilateral com tosse e dispneia. Verifica-se ainda depressão, anorexia e diarreia seguida de vômito. Os sinais neurológicos, que variam de acordo com as áreas do sistema nervoso central envolvidas, podem coincidir com os sinais sistêmicos, mas geralmente iniciam-se uma a três semanas após recuperação destes sinais e são tipicamente progressivos. Por outro lado, os sinais neurológicos podem surgir vários meses depois sem sinais sistêmicos precedentes. Pode também ocorrer dermatite vesicular ou pustular em cachorros e hiperqueratose nasal e digital (*“hard pads”*). (Greene & Appel, 2006)

2.2.7 Diagnóstico

O alargado espectro de sinais clínicos, muitas vezes semelhante ao observado noutras doenças respiratórias e entéricas dos cães, dificulta o diagnóstico clínico da esgana, sendo necessário recorrer a testes laboratoriais. Existem múltiplos métodos que detetam a presença do vírus ou alternativamente dos anticorpos contra o CDV.

A deteção do CDV a partir de esfregaços do epitélio conjuntival, tonsilar, genital e respiratório pode ser efetuada utilizando técnicas de imunofluorescência. Contudo, este teste pode originar falsos negativos quando o animal se encontra na fase de recuperação da doença. A imunohistoquímica pode ser utilizada para demonstrar o antigénio nas almofadas plantares ou biópsias de pele, ou em amostras do baço, amígdalas, linfonodos, estômago, duodeno, bexiga e cérebro coletadas *post mortem* (Greene & Appel, 2006). Os métodos serológicos, como ELISA e seroneutralização, apresentam pouco valor em termos de diagnóstico, uma vez que elevados títulos de anticorpos contra o CDV podem resultar de vacinação anterior ou de infecção subclínica ou clínica (Elia et al., 2006). No entanto, um aumento do nível de anticorpos anti-CDV no líquido cefalorraquidiano indica encefalite devido a esgana, uma vez que os anticorpos são localmente produzidos (Greene & Appel, 2006). Um diagnóstico definitivo através do isolamento viral em células caninas é um processo que exige um longo período de tempo, principalmente quando aplicado a amostras clínicas (Elia et al., 2006). O *real-time* PCR com transcriptase reversa (*real time* RT-PCR) deteta o CDV a partir de células da camada leucoplaquetária (*“buffy coat”*) de cães infetados

e também a partir do soro, sangue total, líquido cefalorraquidiano ou urina de cães com sinais neurológicos e sistêmicos de esgana (Shin et al., 1995; Frisk et al., 1999; Saito et al., 2006). A sensibilidade, especificidade e rapidez deste método comparativamente aos métodos convencionais, torna-o na primeira escolha de teste de diagnóstico (Elia et al., 2006). Recentemente, foi desenvolvido um teste baseado na imunocromatografia que permite um diagnóstico rápido na fase inicial de doença e pode ser efetuada tanto pelos veterinários como pelos donos do animal. No entanto, possui uma sensibilidade e especificidade inferior comparativamente ao *real-time* RT-PCR (An, Kim, Song, Kang & Park, 2008).

2.2.8 Vacinação

A vacinação é a principal forma de prevenir a infecção pelo CDV devido à imunidade de longa duração que é obtida. Esta proteção pode ser adequada caso o animal não seja exposto a estirpes altamente virulentas ou a uma elevada concentração de vírus, ou caso o animal se encontre em stress ou imunocomprometido (Greene & Appel, 2006).

A imunização ativa contra a esgana em cães tem sido praticada desde 1923, em que Puntoni produziu uma vacina utilizando tecido proveniente de cérebro de cão infetado com o CDV, inativado pelo formaldeído (Chappuis, 1995). No entanto, estas vacinas eram incapazes de controlar a doença e foram descontinuadas após o aparecimento das vacinas vivas modificadas (VVM) (Greene & Appel, 2006). Embora a utilização das VVM tenha contribuído para uma diminuição do número de infeções pelo CDV, estas apresentam algumas limitações. Por um lado, existe uma interferência entre as VVM e os anticorpos maternos, o que resulta numa proteção insuficiente das ninhadas provenientes de fêmeas vacinadas. Por outro lado, estas vacinas estão associadas a um risco de reversão à virulência e várias espécies de animais selvagens têm sido vítimas de infeções fatais devido à aplicação destas vacinas (Deem et al., 2000). Face a esta situação, as vacinas de DNA estão a ser desenvolvidas como estratégia de vacinação alternativa, uma vez que estas têm a capacidade de ultrapassar algumas limitações das VVM, nomeadamente a interferência com os anticorpos maternos (Jensen, Nielsen, Aasted & Blixenkrone-Møller, 2009). De notar também que nos últimos anos têm ocorrido falhas de vacinação que, segundo alguns autores, se podem dever à circulação global das diferentes linhagens do CDV (Zhao et al., 2010; Panzera et al., 2012).

2.3 Coronavírus canino

2.3.1 Taxonomia

O coronavírus canino (CCoV) é um agente patogénico que provoca uma enterite ligeira a moderada em cães, e a sua infecção é caracterizada por uma elevada morbilidade e baixa mortalidade. Os coronavírus pertencem à família *Coronaviridae*, que se inclui na ordem

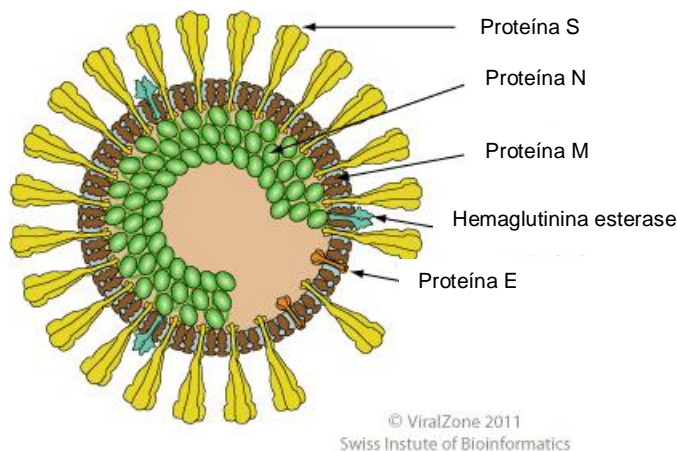
Nidovirales (Pratelli et al., 2003; Pratelli et al., 2008). De acordo com a nova taxonomia, a família *Coronaviridae* inclui duas subfamílias: *Coronavirinae* e *Torovirinae*. Com base nas características genéticas e serológicas, a subfamília *Coronavirinae* foi dividida em três novos gêneros: *Alpha*-, *Beta*-, e *Gammacoronavirus* (conhecidos anteriormente por grupo 1, 2 e 3 respectivamente) (Carstens, 2010). O CCoV pertence à espécie *Alphacoronavirus-1*, juntamente com o vírus da gastroenterite transmissível (TGEV) porcina e com o coronavírus felino (FCoV) (Carstens, 2010).

2.3.2 Estrutura molecular

Os viriões do CCoV são partículas esféricas com envelope, com um diâmetro compreendido entre 100 e 120nm (ver Figura 3-a). No interior destas partículas encontra-se um genoma RNA de cadeia simples com sentido positivo, cujo tamanho varia entre 27-31 kb, sendo o maior genoma de RNA conhecido (Pratelli, 2006) (ver Figura 3-b). Os dois primeiros terços deste genoma, partindo da extremidade 5', consistem em duas ORF's, 1a e 1b, que codificam proteínas não-estruturais correspondentes a um precursor da polimerase RNA dependente de RNA e proteases. O último terço contém ORF's que codificam as proteínas estruturais S (*spike*), E (envelope), M (membrana) e N (nucleocápside) (Decaro & Buonavoglia, 2008). A glicoproteína S possui um papel importante na patogênese do CCoV, uma vez que é responsável pela ligação e fusão entre o envelope e a membrana celular, assim como pela fusão entre células (de Haan, Vennema & Rottier, 2000). A proteína E é uma proteína integral da membrana e, juntamente com a proteína M, participa na formação da partícula viral (Vennema et al., 1996). A proteína M corresponde a uma glicoproteína do tipo III e é o componente estrutural mais abundante. A proteína N consiste numa fosfoproteína que se une ao RNA viral, formando uma nucleocápside helicoidal. Alguns coronavírus possuem ainda uma glicoproteína membranária, a hemaglutinina esterase (Zeng, Langereis, van Vliet, Huizinga & De Groot, 2008). Existem ORF's adicionais que codificam proteínas não-estruturais, que se encontram intercalados no genoma. A função da maior parte destes genes não é ainda conhecida e a maior parte deles não é essencial para a replicação viral, mas podem ter estar associados à virulência e espectro de hospedeiros do CCoV (Haijema, Volders & Rottier, 2004).

Figura 3 – Estrutura molecular (a) e genoma dos coronavírus (b) (adaptado de <http://www.expasy.ch/viralzone>).

(a)



(b)



Os números correspondem a ORF's de função desconhecida intercalados no genoma. As letras indicam as proteínas estruturais: HE - hemaglutinina esterase; S – *spike*; E – envelope; M – membrana; N – nucleocápside.

2.3.3 História evolutiva

Em 1971, o CCoV foi pela primeira vez identificado em cães que manifestavam uma enterite aguda, numa unidade militar canina na Alemanha (Binn et al., 1974). A partir dessa data, este vírus têm sido isolado em todo o mundo (Bandai, Ishiguro, Masuya, Hohdatsu & Mochizuki, 1999; Naylor, Monckton, Lehrbach & Deane, 2001; Stavisky et al., 2010; Soma et al., 2011). Apesar de se verificar um maior número de mortes caso o animal apresente infecções conjuntas com outros agentes patogénicos, como por exemplo CPV-2, adenovírus canino tipo 1 e CDV, o CCoV isoladamente representa um agente infeccioso importante, responsável por várias epizootias (Pratelli, 2006; Decaro & Buonavoglia, 2008).

Em 2001, uma análise da sequência de vários CCoVs detetados em amostras fecais de cães com diarreia em Itália revelou uma substituição de vários nucleótidos ao nível do gene M (Pratelli et al., 2001b). Estas mutações foram também posteriormente observadas em sequências do vírus provenientes das fezes de dois cachorros naturalmente infetados. Estes CCoVs, diferentes daqueles detetados em 1971, evidenciavam uma grande semelhança em relação ao FCoV (Pratelli et al., 2003a). Estes vírus foram então designados inicialmente

como “FCoV-*like* CCoVs”. Foi também feita uma análise da sequência do gene S, que demonstrou que esta nova estirpe apresentava uma semelhança de 81% relativamente ao gene S do FCoV-I. Comparando os “FCoV-*like* CCoVs” com o primeiro CCoV detetado e com o FCoV tipo II (FCoV-II), esta semelhança era apenas de 54% (Pratelli et al., 2003b). Assim, com base na sua relação genética com o FCoV-I, os “FCoV-*like* CCoVs” foram denominados CCoV tipo I enquanto que os CCoVs iniciais designaram-se CCoV tipo II (Pratelli, 2006). Estes dois tipos de CCoV são também conhecidos como CCoVs entéricos. Contrariamente aos FCoVs, os dois genótipos do CCoV são vulgarmente detetados em simultâneo no mesmo animal, permitindo a recombinação genética (Pratelli et al., 2004a). Parece também existir uma relação entre o CCoV e o TGEV, uma vez que possivelmente o TGEV surgiu a partir do CCoV-II (Lorusso et al., 2008). A recombinação entre estes dois vírus conduziu à emergência de um novo genótipo de CCoV-II, inicialmente denominado TGEV-*like* CCoV. Tendo em conta esta nova descoberta, o CCoV-II foi dividido em dois novos subtipos CCoV-IIa e CCoV-IIb, correspondentes ao genótipo inicial e ao recombinante de TGEV, respetivamente (Decaro et al., 2009). O CCoV-IIb já foi identificado em Itália e no Reino Unido (Decaro et al., 2009; Erles & Brownlie, 2009). O aparecimento destes subtipos pode criar implicações nos programas de profilaxia, uma vez que os cães imunizados com as vacinas clássicas de CCoV podem ser suscetíveis à infeção pelo vírus recombinante (Decaro et al., 2009).

Recentemente, foi descrita uma estirpe do CCoV altamente virulenta (CB/05), responsável por doença sistémica e morte em cachorros (Buonavoglia et al., 2006). Este biótipo denominou-se CCoV pantrópico e foi isolado em todos os tecidos do organismo. Este facto sugere uma alteração do tropismo do CCoV, adquirindo este a capacidade de se difundir a todos os outros órgãos, enquanto que durante a infeção pelos CCoVs entéricos o vírus se restringe geralmente apenas ao aparelho gastrointestinal (Decaro et al., 2012). Para além disso, verificou-se que esta estirpe consegue infetar cães que se encontram imunizados contra os CCoVs entéricos, provocando tanto sinais sistémicos como gastrointestinais (Decaro et al., 2010b). Apesar dos cães seropositivos aos CCoVs entéricos serem suscetíveis ao coronavírus pantrópico, os sinais clínicos manifestados por estes animais são moderados comparativamente aos cães seronegativos, provavelmente devido à proteção cruzada induzida pelos anticorpos contra os CCoVs entéricos (Decaro et al., 2010b).

Outro exemplo da evidente evolução dos coronavírus dos cães, como consequência da acumulação de mutações, é a recente identificação de um novo coronavírus, o coronavírus respiratório canino (CRCoV). Este vírus foi isolado pela primeira vez no Reino Unido (Erles Toomey, Brooks & Brownlie, 2003) em amostras provenientes da traqueia e pulmão de cães com sinais clínicos respiratórios ligeiros. Contrariamente aos CCoVs entéricos tipo I e tipo II, o CRCoV é um *Betacoronavirus* (Carstens, 2010) que provoca dificuldades respiratórias, especialmente quando associado a outros agentes patogénicos (Decaro et al., 2007b).

Desde a sua primeira detecção, o CCRCoV já foi encontrado noutros países europeus, assim como no Canadá e Japão (Decaro & Buonavoglia, 2008).

2.3.4 Epidemiologia

O CCRCoV é altamente contagioso e difunde-se rapidamente através de grupos de animais suscetíveis. Cães recém-nascidos são mais afetados que aqueles no desmame e que em cães adultos (McCaw & Hoskins, 2006). Uma vez estabelecido no ambiente, o vírus torna-se muito difícil de controlar. O CCRCoV é eliminado pelas fezes de cães infetados em títulos altos e os animais podem disseminar o vírus até 6 meses após o desaparecimento dos sinais clínicos (Decaro & Buonavoglia, 2008). A transmissão é feita por via fecal-oral e a melhor forma de prevenir a doença consiste em evitar o contacto dos cães com animais infetados assim como com as suas excreções. Ambientes com grandes concentrações de animais, condições higiénicas precárias e stress são fatores que favorecem o desenvolvimento da doença (Pratelli, 2008), muitas vezes verificados em canis. Tal como outros vírus com envelope, o CCRCoV é inativado pela maior parte dos solventes lipídicos, formalina, fenol, solução de hipoclorito e β -propiolactona. A capacidade de infeção do vírus mantém-se estável a 56°C até 30 minutos, mas tende a diminuir rapidamente a 65 e 75°C; pode ser armazenado durante anos a -70°C ou liofilizado a 4°C. O CCRCoV apresenta maior estabilidade a pH 6.0-6.5 e é inativado em condições extremamente ácidas. (Pratelli, 2008).

2.3.5 Patogénese

O período de incubação do CCRCoV é de 1 a 4 dias e o vírus pode ser isolado das fezes de cães infetados entre 3 a 14 dias após infeção. Após ingestão, o CCRCoV desloca-se para as células epiteliais maduras das vilosidades do intestino delgado onde se multiplica e acumula nos vacúolos citoplasmáticos. A partir destas estruturas, os viriões são libertados diretamente no ambiente. Após a produção do vírus, as células infetadas sofrem alterações citoplasmáticas severas, e as microvilosidades da bordadura em escova tornam-se curtas e distorcidas. Como resultado, as células infetadas são eliminadas das vilosidades a um ritmo acelerado e são substituídas rapidamente por células imaturas da cripta da mucosa. O epitélio das criptas não é destruído e desenvolve-se hiperplasia. Assim, as vilosidades afetadas ficam recobertas por um epitélio cuboidal, que apresenta um nível de atrofia e fusão variável, e é infiltrado por células mononucleares na lâmina própria. Contrariamente ao que se verifica numa infeção por CPV, a necrose e hemorragia das vilosidades são raras (McCaw & Hoskins, 2006).

2.3.6 Quadro clínico

O CCoV é conhecido por causar infecções auto-limitantes do intestino delgado, que conduzem ao aparecimento de sinais clínicos típicos de gastroenterite. Estes sinais podem variar bastante e a doença verifica-se em cães de qualquer idade, raça ou sexo. Pode ser difícil a diferenciação entre o CCoV e as outras causas infecciosas de enterite, embora a infecção pelo CCoV seja geralmente menos dramática que a provocada pelo CPV-2. Geralmente os sinais clínicos iniciais consistem em diarreia súbita, por vezes precedida de vômito. As fezes apresentam uma cor alaranjada característica, têm um odor fétido e raramente contêm sangue. Pode-se também observar perda de apetite e letargia. Contrariamente à infecção pelo CPV-2, a febre não é constante e a leucopénia nem sempre se verifica. Em casos mais graves, a diarreia pode ser aquosa, ocorrendo desidratação e desequilíbrio eletrolítico. Apesar de já se ter observado descargas nasais e oculares, desconhece-se a sua relação com a causa primária. A maioria dos cães recupera espontaneamente após 8 a 10 dias. No entanto, quando existem fatores secundários como parasitas, bactérias ou outros vírus, a doença pode-se prolongar. (McCaw & Hoskins, 2006). Contrariamente aos CCoVs entéricos, a estirpe CB/05 provoca uma doença mais grave e tem a capacidade de causar sinais sistémicos para além dos gastrointestinais. Alguns dos sinais incluem febre, diarreia hemorrágica, linfopénia severa e sinais neurológicos seguidos de morte (Decaro et al., 2007d).

2.3.7 Diagnóstico

Como foi referido anteriormente, o facto de ser difícil diferenciar os sinais clínicos causados pelos CCoVs entéricos daqueles associados a outros agentes patogénicos como CPV-2, rotavírus canino ou adenovírus canino, torna-se necessário recorrer ao diagnóstico laboratorial. Das diversas técnicas disponíveis para deteção do CCoV incluem-se a microscopia eletrónica, isolamento viral em culturas celulares e análise biomolecular. A microscopia eletrónica permite identificar o CCoV, embora existam frequentemente falsos-positivos (McCaw & Hoskins, 2006). Para além disso, este método exige técnicos e laboratórios especializados (Pratelli et al., 2000). O isolamento viral pode também ser utilizado, mas apresenta uma maior complexidade, exige um maior período de tempo e tem uma sensibilidade menor relativamente aos outros métodos. Ao longo da última década, vários métodos baseados no PCR têm sido desenvolvidos para detetar RNA nas fezes dos cães, permitindo ultrapassar as limitações associadas ao isolamento viral e à microscopia eletrónica (Decaro et al., 2004; Decaro et al., 2005b). Esta técnica apresenta uma maior sensibilidade e especificidade, comparativamente aos métodos convencionais (Pratelli et al., 2000).

2.3.8 Vacinação

Devido ao aparecimento de novos genótipos e biótipos de CCoV, têm sido colocadas diversas questões acerca do desenvolvimento de novas vacinas. Trabalhos anteriores evidenciaram que as vacinas inativadas utilizadas contra os CCoVs entéricos são pouco eficazes. Atualmente, todas as vacinas são baseadas no CCoV-II (McElligott et al., 2011; Soma et al., 2011). No entanto, estudos demonstraram que a proteção cruzada a nível serológico entre o CCoV-I e CCoV-II pode ser limitada (Pratelli et al. 2004b). Para além disso, tendo em conta que a imunidade induzida pela infeção natural pelos CCoVs entéricos não possui a capacidade para proteger os animais contra o CCoV pantrópico, a eficácia das vacinas preparadas a partir dos CCoVs entéricos torna-se insuficiente face ao aparecimento deste novo biótipo. Assim, cães vacinados contra os CCoVs entéricos podem adquirir infeções subclínicas da estirpe CB/05, provocando linfopénia. Esta situação pode predispor ao aparecimento de agentes patogénicos oportunistas, o que pode resultar numa doença mais severa com gravidade semelhante à doença causada por vírus como CPV-2 ou CDV (Decaro et al., 2010b). Adicionalmente, o TGEV-*like* CCoV (CCoV-IIb) apresenta fraca reatividade serológica com o CCoV-II inicial (CCoV-IIa), estirpe a partir da qual são fabricadas as vacinas atuais (Decaro et al., 2009). Face à elevada frequência de mutações dos vírus de RNA, o aparecimento de novos genótipos (CCoV-I), biótipos (CCoV pantrópico) e variantes (CRCoV) dificulta a implementação de vacinas eficazes (McElligott et al., 2011).

3. Material e métodos

3.1 População estudada e recolha de amostras

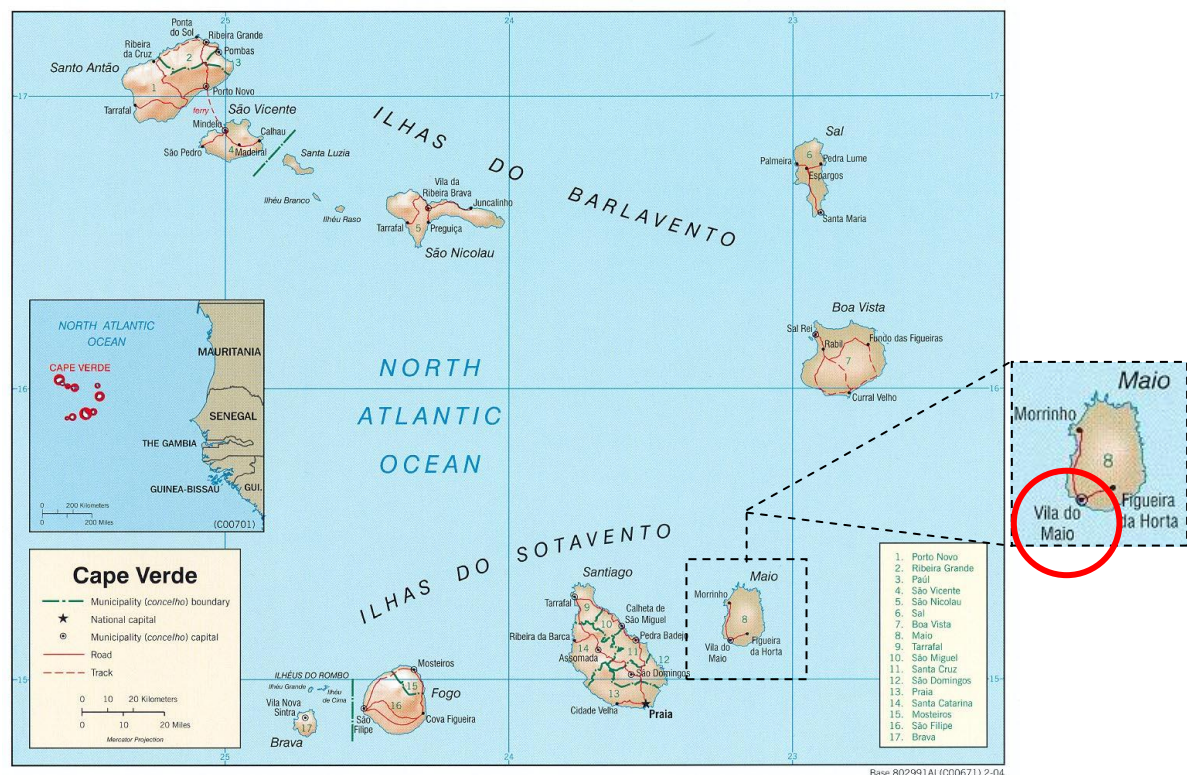
A recolha de amostras de cães efetuada na Vila do Maio em Cabo Verde realizou-se em dois períodos distintos: uma no ano de 2010, que envolveu um total de 53 animais e outra no ano de 2011 que compreendeu 125 cães (ver Figura 4). Em 2010, apenas se obtiveram zaragatoas retais, enquanto que em 2011 foi também colhido o sangue de alguns dos animais, para além das zaragatoas. Assim, dos 125 cães amostrados neste último ano, registaram-se 88 amostras de sangue e 93 zaragatoas retais, havendo 56 animais coincidentes nos dois tipos de amostra (ver Tabela 2). O sangue foi colhido a partir da veia cefálica e transferido para tubos EDTA. As zaragatoas retais e as amostras de sangue foram armazenadas sob refrigeração até ao seu processamento.

Tabela 2 – Número de amostras colhidas em cada ano.

	2010	2011
Zaragatoas retais	53	37
Sangue	-	32
Zaragatoa retal + Sangue	-	56
Total	53	125

Figura 4 – Arquipélago de Cabo Verde. Local de colheita de amostras assinalado com um círculo (Vila do Maio – Ilha do Maio)

(http://images.nationmaster.com/images/motw/africa/cape_verde_rel_2004.jpg).



3.2 Processamento de amostras

As zaragatoas retais foram homogeneizadas em 300 µl de PBS. Após centrifugação a 10000xg/10 minutos, o sobrenadante foi colhido e armazenado a -80°C, até à sua utilização. As amostras de sangue foram centrifugadas a 4000xg/10 minutos para separação entre as células sanguíneas e o plasma. O plasma foi armazenado a -20°C até processamento.

3.3 Extração de ácidos nucleicos

Para extração de ácidos nucleicos virais a partir dos homogeneizados retais, utilizaram-se 200 µl do sobrenadante de cada amostra, que foram processados com o *kit* Qiampl Minelute® (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, para co-extração de DNA e RNA extracelular. Cada amostra foi homogeneizada em 200 µl de tampão desnaturante (AL) ao qual se adicionaram 20 µl de protease. Após incubação a 56°C durante 15 minutos, adicionaram-se 200 µl de etanol, para precipitação dos ácidos nucleicos. Esta mistura foi aplicada numa coluna de sílica, para fixação seletiva dos ácidos nucleicos. Após lavagens sucessivas com os tampões indicados no *kit*, os ácidos nucleicos foram eluídos da membrana por aplicação do tampão aquoso AVE, sendo posteriormente quantificados no Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

3.4 Detecção ácidos nucleicos através de *Real-time* PCR e *Real-time* RT-PCR

Para deteção dos ácidos nucleicos virais, as amostras foram submetidas a um *real-time* PCR e *real-time* RT-PCR. Estes métodos são baseados nas técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) e utilizam um par de iniciadores (*primers*) para amplificar várias cópias de uma sequência de DNA ou RNA respetivamente, permitindo a deteção em tempo real da amplificação da sequência alvo. As reações de *real-time* são realizadas num termociclador que efetua a medição da emissão de fluorescência, indicativa da amplificação e quantificação da região amplificada. Existem vários métodos baseados na emissão de fluorescência. Neste trabalho recorreu-se à tecnologia *TaqMan*® da *Applied Biosystems*, na qual se utiliza um terceiro *primer* (sonda) específico marcado com um fluoróforo (*reporter*) na extremidade 5' e um *quencher* na extremidade 3'. A sonda liga-se numa região delimitada pelos *primers* forward e reverse. Enquanto não se verifica ligação da sonda à região correspondente do DNA, o *reporter* e o *quencher* mantêm-se próximos um do outro e o *quencher* inibe a emissão de fluorescência pelo *reporter*. Após a ligação da sonda e dos *primers* à sequência alvo, a atividade de exonuclease 5'-3' da Taq polimerase hidrolisa a sonda, induzindo o consequente afastamento entre o *reporter* e o *quencher*, levando à emissão de fluorescência, que é proporcional à quantidade de produto final amplificado. Se a sequência alvo não está presente, a sonda não se liga e não ocorre emissão de fluorescência (Van Guilder, Vrana & Freeman, 2008).

Neste trabalho, os ácidos nucleicos foram amplificados utilizando o *mix* comercial *TaqMan*[®] *Gene Expression Master Mix*, que inclui o tampão de reação, a enzima e os dNTP necessários à reação de amplificação. As reações de amplificação de ácido nucleico de CPV e CDV foram efetuadas no termociclador *One Step Plus – Applied Biosystems* e para o CCoV utilizou-se o termociclador *Real-time 7300 – Applied Biosystems*. Sempre que o template era RNA, os ciclos de amplificação incluíam um passo de transcrição reversa (ver Tabela 5). Os *primers* e a sonda *TaqMan*[®] foram calculados através do programa *Primer designing tool* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (ver Tabela 3). A sua concentração final na reação de amplificação variou entre 0,3-0,9 µM para o *primer* forward e 0,9 µM e 0,25 µM de *primer* reverse e sonda, respetivamente (ver Tabela 4). As reações de amplificação foram efetuadas no volume final de 20 µl e a quantidade de ácidos nucleicos utilizada para cada amostra foi de 50ng.

Para o CPV, os *primers* foram escolhidos com base na sequência nucleotídica do gene *vp1*, disponível no GenBank através do seu número de acesso (NA) AB437433.1. Os *primers* selecionados para o CDV amplificam uma região incluída no gene *n* (NA JN896987.1). Para o CCoV, os *primers* basearam-se na sequência do gene *7b* (NA JQ404410.1).

Tabela 3 – Primers e sondas utilizados no *real-time* PCR e *real-time* RT-PCR para amplificação das sequências dos diferentes vírus, sua localização e dimensão dos fragmentos obtidos.

Vírus	Primers e sonda Sequência (5' → 3')		Posição no genoma	Fragmento
CPV	Forward	GGGCCTGGGAACAGTCTTGACC	125-146	99pb
	Reverse	ACCAGAGCGAAGATAAGCAGCGT	223-201	
	Sonda	FAM CGCCGCTGCAAAAGAACACGACGAAGC TAMRA	172-198	
CDV	Forward	TGGCACTCATTTTGGACATCAA	808-829	100pb
	Reverse	GCTAACCCAGCTTCCACAATGTA	907-885	
	Sonda	FAM TCCCCAGGGAACAAGCCTAGAAATTGCT TAMRA	834-860	
CCoV	Forward	TGGTCATCGCGCTGTCTACT	29117-29136	66pb
	Reverse	AGGGTTGCTTGTACCTCCTATTACA	29183-29159	
	Sonda	FAM TTGTACAGAATGGTAAGCAC TAMRA	29138-29157	

Tabela 4 – Concentrações dos primers e sondas utilizadas no *real-time* PCR para os diferentes vírus.

Vírus	Primer forward	Primer reverse	Sonda
CPV	0,9 µM	0,9 µM	0,25 µM
CDV	0,9 µM	0,9 µM	0,25 µM
CCoV	0,3 µM	0,9 µM	0,25 µM

Tabela 5 – Ciclos térmicos utilizados no *real-time* PCR para os diferentes vírus.

Vírus	Transcrição reversa	Desnaturação	Annealing	Extensão
CPV	-	95°C/10 min	90°C/15 seg 50 ciclos	60°C/1 min
CDV e CCoV	48°C/15 min	95°C/10 min	90°C/15 seg 50 ciclos	60°C/1 min

Como controlo positivo no *real-time* PCR para CPV, foi utilizada uma diluição da estirpe de CPV presente na vacina Tetradog[®] (CPV-2 Cornell-780916). Na deteção do CDV, o controlo positivo correspondeu a um plasmídeo recombinante de CDV, cujo *insert* de 287bp foi amplificado a partir da estirpe do vírus presente na vacina Caniffa[®] de acordo com Frisk et al. (1999). A construção do plasmídeo recombinante foi realizada por ligação do produto de PCR, com 50ng de plasmídeo pGEM (Promega), na presença de T4DNA ligase, a 4°C durante a noite. Esta ligação foi posteriormente utilizada para transformar células competentes (E. Coli DH5α), as quais foram plaqueadas em LBamp/IPTG/Xgal e incubadas durante 24h. Em seguida, as colónias brancas foram repicadas e foi confirmada a presença do plasmídeo recombinante nas células através de PCR convencional (Frisk et al., 1999). Os clones recombinantes positivos foram posteriormente armazenados em LB e glicerol (1:1) a -80°C. Para extração do DNA plasmídico utilizou-se um *kit* comercial, de acordo com as instruções do fabricante, baseado no processo de lise alcalina (Birnboim & Doly, 1979). O plasmídeo foi sequenciado pela empresa STABvida Portugal, para confirmação da clonagem, tendo sido utilizado posteriormente como controlo positivo da reação. Tal como para o CDV, o controlo positivo usado para a identificação do CCoV consistiu num plasmídeo recombinante, obtido anteriormente, para utilização no diagnóstico molecular de coronavírus (CIISA, FMV/UTL).

3.5 Deteção de anticorpos

A deteção de anticorpos a partir do plasma foi apenas realizada para os vírus CPV e CDV e utilizou-se para o efeito um *kit* ELISA indireta (Ingezim Parvo Canino 15.CPV.K1[®] e Ingezim Moquillo 1.5.CDG.K.1[®] - Ingenasa), de acordo com as instruções do fabricante, para deteção de IgG específicas. Nesta técnica, os poços da placa presente no *kit* encontram-se revestidos por antígeno do respetivo vírus. Caso os plasmas contenham anticorpos contra o vírus, estes irão ligar-se ao antígeno presente na placa. Seguidamente, adiciona-se um anticorpo anti-IgG canina conjugado com peroxidase, que se ligará especificamente aos anticorpos do cão. Finalmente, é adicionado o substrato e o cromogénio, que na presença da peroxidase desencadeia uma reação colorimétrica. Assim, os poços que apresentem cor corresponderão aos plasmas positivos para o anticorpo em questão. Os plasmas foram

diluídos a 1:100 tendo sido adicionados 100 µl a cada poço da placa respetiva de cada vírus. Após incubação à temperatura ambiente (22°C) numa Estufa BINDER Modelo KB 115 durante 10 minutos a placa foi lavada por 4 vezes num lavador Thermo electron corporation Wellwash 4 MK2. Após adição de 100 µl de conjugado (anti-IgG canina), a placa foi novamente incubada à mesma temperatura durante 10 minutos, sendo posteriormente lavada do mesmo modo. Adicionaram-se então 100 µl de substrato e cromogéneo, mantendo-se a reação durante 5 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, juntaram-se 100 µl de solução de paragem e procedeu-se imediatamente à leitura das densidades óticas a 450 nm num espectrofotómetro TECAN, Sunrise remote A-5002.

Este método permitiu quantificar o título de anticorpos presente no plasma, para o caso do CPV, utilizando-se uma fórmula fornecida pelo *kit*, embora o mesmo não especifique a correspondência com outras técnicas de quantificação de anticorpos anti-CPV, como por exemplo a inibição de hemaglutinação, que é a mais utilizada para este vírus. Quanto ao CDV, os resultados foram ordenados em três classes diferentes: 1) baixo título (valores de IFI de 1/20-1/40); 2) título médio (valores de IFI de 1/80-1/160) e 3) título alto (valores de IFI de $\geq 1/320$), com correspondência a títulos de imunofluorescência indireta (IFI).

3.6 Análise estatística

Uma possível associação entre os resultados serológicos e a idade e o género dos animais foi determinada através do teste estatístico Qui-Quadrado (χ^2) do programa IBM SPSS *Statistics* 19.0. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4. Resultados

4.1 Registos fornecidos pelos VSF

Relativamente à recolha de 2011, foi possível aceder aos registos de cada animal, embora em alguns casos essa informação estivesse incompleta. Todos os animais eram de raça indeterminada. Do total de 125 cães, 65 eram fêmeas (52%), 57 eram machos (46%) e 3 não foram registados (2%). Verificou-se que apenas 13 animais eram castrados (10%). Vinte e sete (22%) apresentavam uma idade inferior a 6 meses; 18 tinham entre 6 meses e 1 ano (14%); 24 entre 1 e 2 anos (19%); 40 entre 2 e 5 anos (32%); 9 entre 5 e 7 anos (7%) e apenas um animal possuía idade superior a 7 anos (1%). Em 6 cães não foi registada a idade (5%). A maioria destes animais apresentava uma conformação corporal normal (63%), existindo porém uma percentagem considerável de animais magros (32%) e poucos cães eram obesos (5%). Observou-se ainda que 4 animais (3%) tinham diarreia. No entanto, não foi possível obter esta última informação em 14 cães (11%) (ver Tabela 6). Soube-se também que apenas dois cães tinham sido vacinados no ano de 2010 (vacina Tetradog[®]).

Tabela 6 – Detalhe dos registos relativos às amostras de 2011.

Sexo	Idade (anos)							Castrado		Conformação corporal			Total
	< 6 m	6 m - 1	1-2	2-5	5-7	> 7	NR	Sim	Não	Magro	Normal	Obeso	
Macho	12	7	8	21	5	1	3	9	48	20	33	4	57
Fêmea	13	11	16	19	4	0	2	4	61	18	45	2	65
NR	2	0	0	0	0	0	1	0	3	2	1	0	3
Total	27	18	24	40	9	1	6	13	112	40	79	6	125
Diarreia													Total
Sim	1	1	1	1	0	0	0	1	3	3	1	0	
Não	26	14	18	36	8	1	4	9	98	29	73	6	
NR	0	3	5	3	1	0	2	3	11	8	5	0	
Total	27	18	24	40	9	1	6	13	112	40	79	6	125

4.2 Aferição da sensibilidade do *real-time* PCR e *real-time* RT-PCR

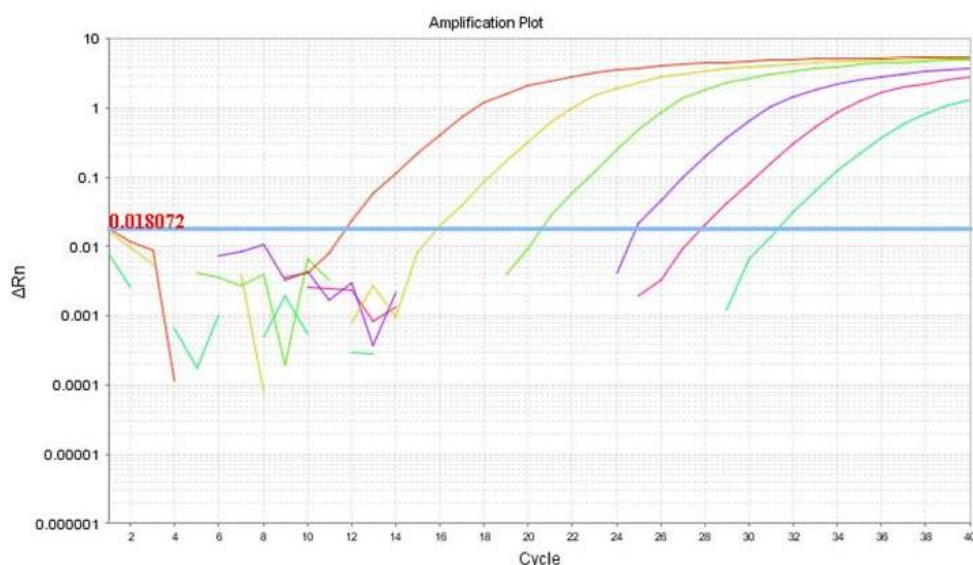
Para aferir a sensibilidade da deteção de ácidos nucleicos, foram efetuadas 6 diluições seriadas de base 10 (10^{-1} a 10^{-6}) do controlo positivo respetivo de cada vírus. (ver Figura 5).

O cálculo do número de cópias detetado foi efetuado com base na conversão da massa do controlo positivo (g/μl) em moléculas/μl, com base na seguinte fórmula:

Número de cópias-alvo (moléculas/μl) = [concentração em g/μl / (número de pares de bases x peso molecular médio de um par de bases (660))] x número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$).

A sensibilidade do *real-time* PCR para os três agentes foi de 10-30 moléculas/μl.

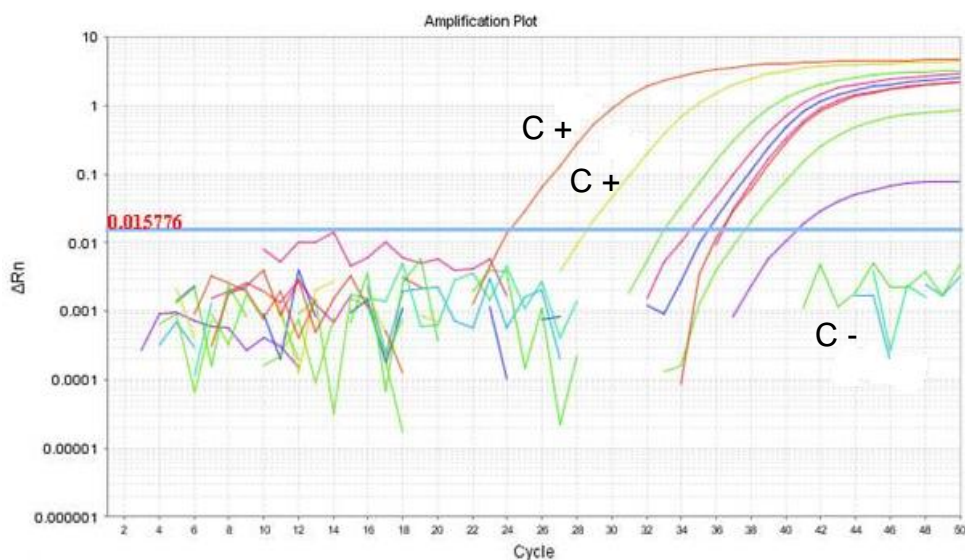
Figura 5 – Curva de amplificação das diluições do controle positivo do CPV (original).



4.3 CPV – *real-time* PCR e ELISA

Em relação aos resultados do *real-time* PCR referentes ao ano de 2010, num total de 53 animais, registaram-se 23 amostras positivas ao CPV (43,3%). Nas amostras de 2011, este vírus foi detetado em 41 animais, num total de 93 (44,1%) (ver Figura 6 e Tabela 7).

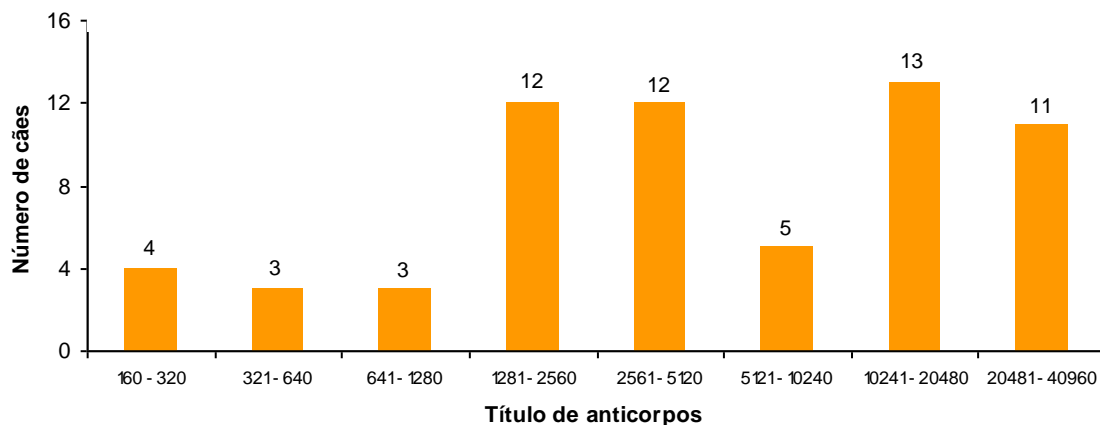
Figura 6 – Curvas de amplificação de amostras positivas e negativas ao CPV e respetivos controlos positivos e negativos (original).



Relativamente aos resultados serológicos, os valores de absorvância medidos para os controlos positivo e negativo confirmaram a validade do teste de ELISA. Num total de 88 animais, os resultados revelaram a presença de 63 amostras positivas a anticorpos contra o CPV (71,6%). Como o *kit* não especificava a correspondência dos títulos de anticorpos com

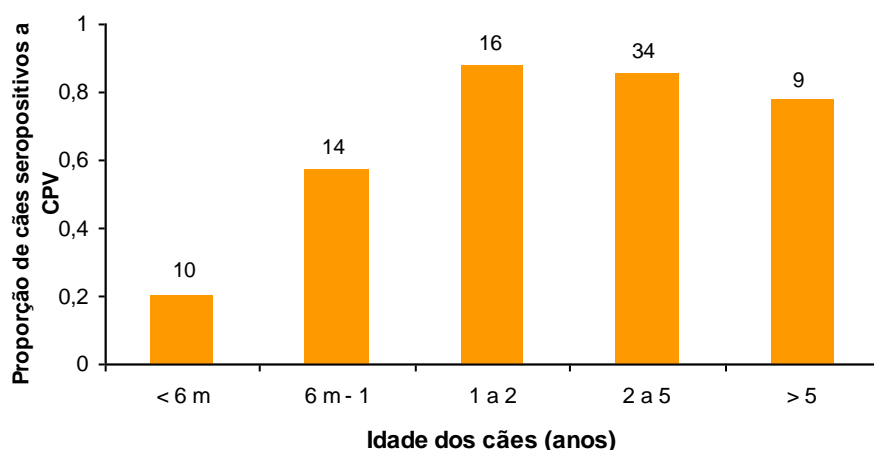
outras técnicas de quantificação de anticorpos anti-CPV, como por exemplo a inibição de hemaglutinação, que é a mais utilizada para este vírus, não foi possível comparar estes resultados com aqueles obtidos noutros estudos (ver Gráfico 1).

Gráfico 1 – Distribuição dos títulos de anticorpos das amostras seropositivas ao CPV.



Detetaram-se anticorpos em 20% dos animais com menos de 6 meses (2/10); 57,1% nos cães com idades entre 6 meses e 1 ano (8/14); 87,5% na classe de entre 1 a 2 anos (14/16); 85,3% nos cães de 2 a 5 anos (29/34); 77,8% nos cães com mais de 5 anos (7/9) (ver Gráfico 2). A proporção de animais seropositivos era significativamente superior nos animais mais velhos ($p < 0,05$). Por outro lado, não se registaram diferenças entre a seroprevalência e o género dos animais ($p > 0,05$).

Gráfico 2 – Proporção de animais seropositivos a CPV de acordo com a idade. Os números acima da linha indicam o número de amostras testadas para cada classe.

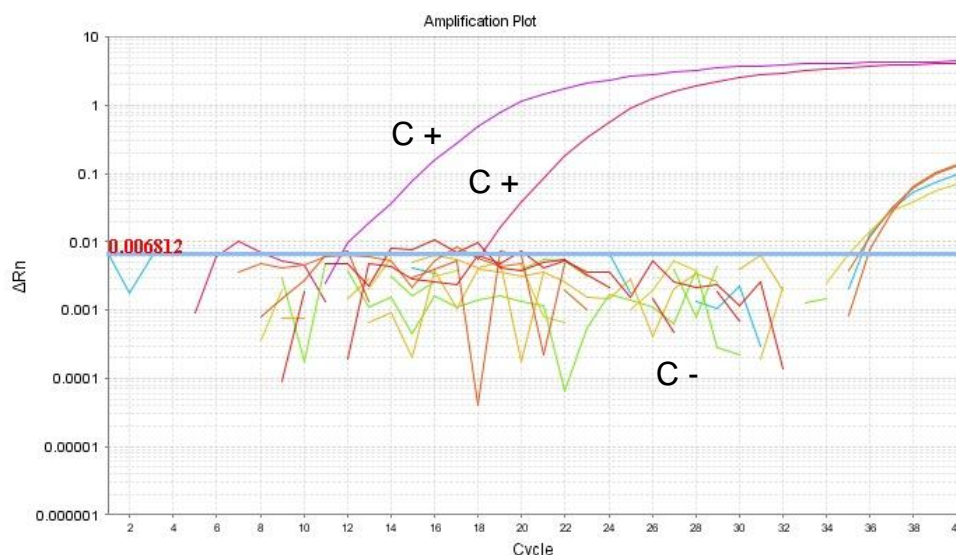


Tendo em conta os 56 animais coincidentes nos dois tipos de amostra, a prevalência obtida por *real-time* PCR e a seroprevalência foram de 46,6% (26/56) e 64,3% (36/56), respetivamente. Sete dos 26 cães que se encontravam a excretar o vírus, não apresentavam anticorpos.

4.4 CDV – *real-time* RT-PCR e ELISA

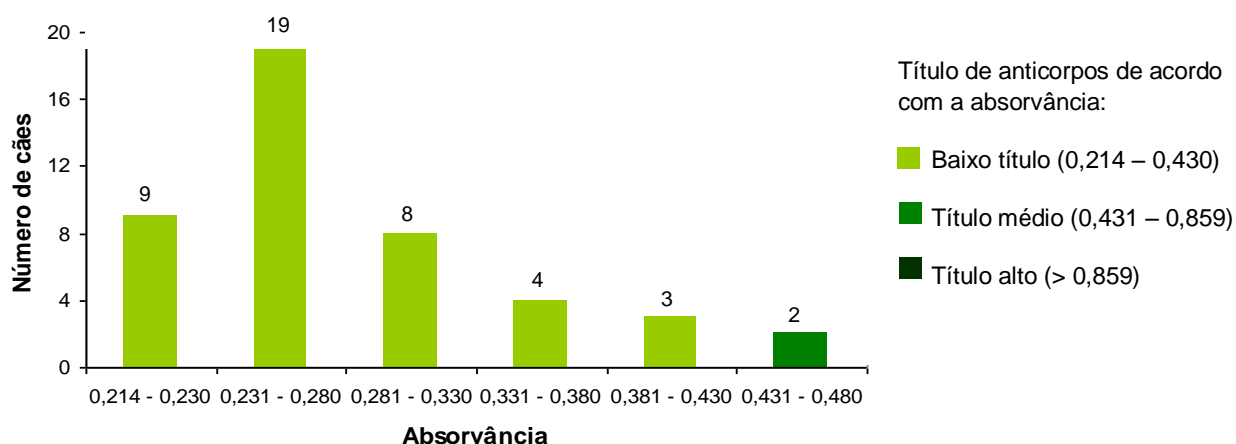
Nos resultados referentes às zaragatoas retais do ano de 2010, num total de 53 animais, registaram-se 6 amostras positivas ao CDV (11,3%). Já na recolha de 2011, não se detetou nenhum resultado positivo a este vírus (ver Figura 7 e Tabela 7).

Figura 7 – Curvas de amplificação de amostras positivas e negativas ao CDV e respetivos controlos positivos e negativos (original).



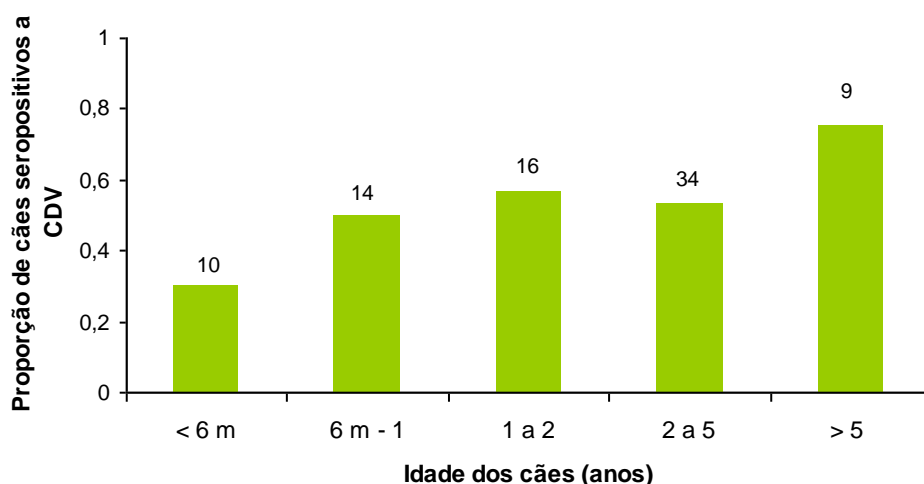
Quanto à serologia, tal como no caso do CPV, os valores de absorvância medidos para os controlos positivo e negativo confirmaram a validade do teste de ELISA. Num total de 88 animais, os resultados revelaram a presença de 45 amostras positivas a anticorpos contra o CDV (51,1%). Recordando as três classes anteriormente referidas, os resultados foram ordenados em: 1) baixo título (valores de IFI de 1/20-1/40); 2) título médio (valores de IFI de 1/80-1/160) e 3) título alto (valores de IFI de $\geq 1/320$). Segundo as instruções fornecidas pelo *kit*, estas três categorias foram determinadas de acordo com intervalos dos valores de absorvância de cada amostra (entre 0,214 e 0,430 – baixo título; entre 0,431 e 0,859 – título médio; maior que 0,859 – título alto). Deste modo, constatou-se que das 45 amostras positivas, 43 apresentavam títulos baixos de anticorpos (96%) e que apenas duas amostras revelaram títulos médios de anticorpos (4%) (ver Gráfico 3). De acordo com Twark & Dodds (2000), um título de anticorpos $\geq 1/5$ (teste de IFI) é considerado protetor, pelo que todas as amostras seropositivas ao CDV neste ensaio contêm um título de anticorpos protetor ($>1/20$).

Gráfico 3 – Distribuição das absorvâncias relativas às amostras positivas ao CDV e legenda das classes de títulos de anticorpos.



Detetaram-se anticorpos em 30% dos animais com menos de 6 meses (3/10); 50% nos cães com idades entre 6 meses e 1 ano (7/14); 56,3% na classe de entre 1 a 2 anos (9/16); 53% nos cães de 2 a 5 anos (18/34); 77,8% nos cães com mais de 5 anos (7/9) (ver Gráfico 4). Apesar de se verificar uma tendência crescente de animais positivos com o aumento da idade, não foi estabelecida associação estatística entre a seroprevalência e a idade dos animais ($p>0,05$). Por sua vez, a presença de anticorpos era independente do género ($p>0,05$).

Gráfico 4 – Proporção de animais seropositivos ao CDV de acordo com a idade. Os números acima da linha indicam o número de amostras testadas para cada classe.



4.5 CCoV – *real-time* RT-PCR

Em 53 animais, relativos à recolha do ano de 2010, apenas se registou um animal positivo a CCoV (1,9%). No ano de 2011, em 93 animais este vírus foi detetado também em apenas um canídeo (1,1%) (ver Figura 8 e Tabela 7).

Figura 8 – Curvas de amplificação da amostra positiva e das amostras negativas ao CCoV e respetivos controlos positivos e negativos (original).

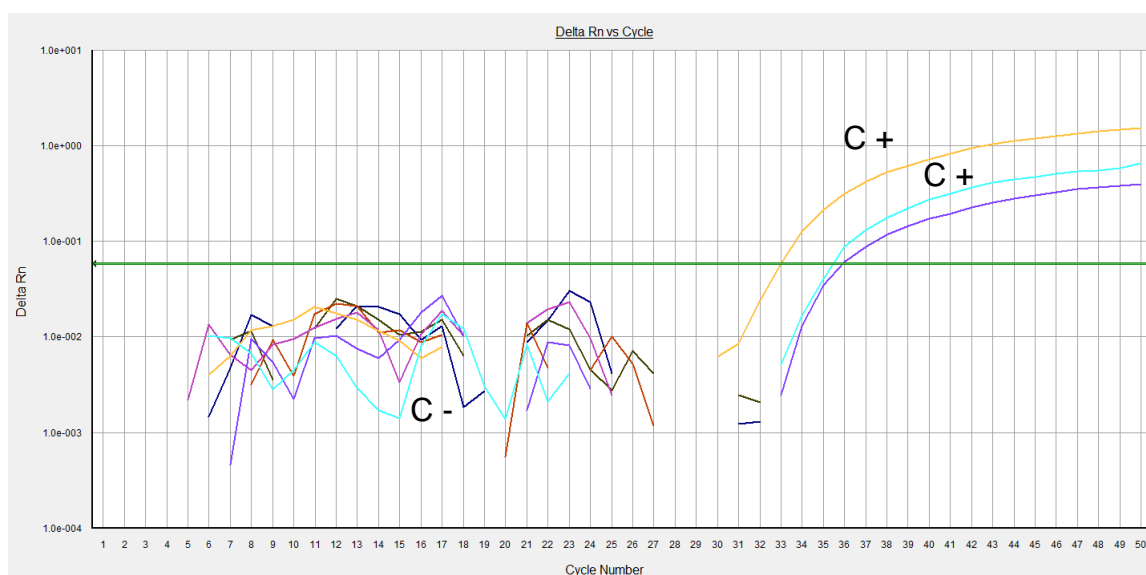


Tabela 7 – Distribuição dos resultados laboratoriais de acordo com o ano.

	2010	2011
Real-time PCR		
CPV	23/53 (43,3%)	41/93 (44,1%)
CDV	6/53 (11,3%)	0/93 (0%)
CCoV	1/53 (1,9%)	1/93 (1,1%)
ELISA		
CPV	-	63/88 (71,6%)
CDV	-	45/88 (51,1%)

5. Discussão

Os vírus são agentes patogénicos responsáveis pela morbilidade e mortalidade de animais em todo o mundo, incluindo não só os animais domésticos mas também as populações de animais selvagens. Assim os estudos epidemiológicos assumem um papel importante na análise e compreensão destes agentes, com o objectivo de se conhecer a sua distribuição global e de saber qual o melhor modo de combater a sua disseminação.

Recordando os objetivos deste trabalho, pretendeu-se determinar a prevalência de CPV, CDV e CCoV em cães errantes da cidade de Vila do Maio (Cabo Verde), através de *real-time PCR* (para os 3 vírus) e ELISA (apenas para CPV e CDV) e avaliar o potencial destes animais na manutenção e disseminação dos vírus referidos tanto nas populações de animais domésticos como nas de animais selvagens. Na ausência de dados relativos à situação epidemiológica de Cabo Verde, as prevalências obtidas foram comparadas com aquelas encontradas em vários estudos efetuados noutros países e os possíveis desvios foram discutidos.

5.1 CPV

Neste estudo, a prevalência de CPV determinada através de *real-time PCR* em relação ao ano de 2010 foi de 43,3%. Em 2011, este valor não sofreu grandes alterações, pelo que este vírus foi detetado em 44,1% dos animais. Ainda neste ano, obteve-se uma seroprevalência para este vírus de 71,6%.

Existem várias publicações científicas que demonstram a seroprevalência do CPV em diversas regiões do globo. No entanto, esta informação apenas permite saber se os animais contactaram ou se estão protegidos contra o vírus, sem se saber se se encontram a excretar para o ambiente. Infelizmente, existe um menor número de artigos referentes à deteção deste agente a partir de DNA proveniente das fezes. Para além disso, tanto no caso do CPV como do CCoV, foi possível constatar que os estudos mais recentes centram-se principalmente na caracterização genética dos vírus em cães diarreicos ou de canis, existindo menos informação sobre a prevalência destes vírus noutras populações mais amplas de canídeos, incluindo cães errantes. Contudo, este tipo de informação é muito importante para o conhecimento e compreensão da epidemiologia dos vírus. Apesar disso, devido ao facto de o CPV apresentar taxas de mutação semelhantes àsquelas observadas em vírus de RNA e de se encontrar em constante evolução, os genótipos deste vírus são alvo de uma crescente e contínua monitorização em todo o mundo.

Num rastreio virológico efetuado por Dezengrini et al. (2007), avaliou-se a seroprevalência de CPV em 817 cães não-vacinados, originários de vários bairros de Santa Maria, Brasil, registando-se um valor de 68,7%. Também no Brasil, num estudo efetuado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Pelotas, Hass et al. (2008) mediram os níveis de anticorpos contra CPV em 132 cães de várias origens: 80 já tinham sido vacinados pelo

menos uma vez, 22 não eram vacinados e desconhecia-se a história de vacinação dos 30 restantes. Foram encontrados anticorpos contra este vírus em 97,7% dos animais. Ainda no Brasil, Strottmann et al. (2008) testaram a presença de anticorpos em 185 amostras de sangue de cães sem história de vacinação, provenientes de diversos bairros do município de Passo Fundo e obtiveram uma prevalência de 96,2%. Uma seroprevalência mais baixa foi registada no sul da Tunísia. Chabchoub et al. (2008) verificou que em 102 cães não vacinados, 55 (53,9%) apresentavam anticorpos anti-CPV. Na ilha Isabella, nas Galápagos, é proibido transporte de cães e gatos entre as ilhas e o continente assim como a vacinação. Apesar disso, Levy et al. (2008) testaram amostras de sangue de 95 cães dessa ilha e verificaram que 100% destes animais apresentavam anticorpos contra o CPV. Os autores colocaram a hipótese de introdução ilegal de cães na ilha ou ainda à entrada de pessoas e mercadorias contaminadas. Mais recentemente, Decaro et al. (2011) analisaram, através de *real-time* PCR, 156 amostras fecais de cães provenientes de vários países da Europa Ocidental (Espanha, Itália, França, Reino Unido, Bélgica e Holanda) e obtiveram uma prevalência média de 48,7%, apesar de todos animais escolhidos para este estudo apresentarem diarreia. No entanto, cerca de metade dos cães não eram vacinados ou não tinham o programa de vacinação completo.

No nosso estudo, comparando as prevalências obtidas a partir das zaragatoas retais nas recolhas de 2010 e 2011 (43,3% e 44,1%, respetivamente), verificou-se que os valores se mantiveram estáveis, o que reflete a elevada resistência ambiental do CPV. A transmissão e disseminação ocorrem mais facilmente, sem que tenha de existir contacto direto entre os animais. Este vírus é excretado a títulos elevados nas fezes e a sua eliminação pode ser prolongada, havendo uma maior oportunidade de contacto entre o vírus e os animais. Apesar da maioria dos cães positivos a ácido nucleico não apresentar diarreia, os animais infetados pelo CPV podem eliminar o vírus mesmo após o desaparecimento dos sinais clínicos, e os cães recuperados podem funcionar como reservatórios assintomáticos e excretar o vírus periodicamente. Este é um mecanismo importante para a persistência e circulação contínua do CPV no ambiente.

O comportamento ambiental do vírus justifica também a seroprevalência elevada obtida (71,6%), semelhante àquelas registadas em estudos efetuados em populações caninas não-vacinadas. Tendo em conta os 56 animais coincidentes nos dois tipos de amostra, a prevalência obtida por *real-time* PCR e a seroprevalência não sofreram grande variação (46,6% e 64,3%, respetivamente). Neste grupo, 7 dos 26 cães que se encontravam a excretar o vírus não possuíam anticorpos contra o mesmo. Possivelmente, estes animais encontravam-se numa fase inicial de infeção, pelo que poderiam apresentar apenas IgM que não foram detetadas pelo *kit* de ELISA, específico para IgG. Infelizmente, não foi possível corresponder os títulos de anticorpos obtidos com a técnica de inibição de hemaglutinação, não sendo possível comparar estes resultados com aqueles obtidos noutros estudos.

A seroprevalência foi significativamente superior em animais adultos comparativamente à dos jovens. Esta diferença pode refletir uma maior probabilidade de exposição ao vírus com o passar do tempo. Por outro lado, como os cães mais jovens são mais suscetíveis ao vírus, podem sucumbir à doença e conseqüentemente são removidos da população. Contudo, existem outros estudos onde não foi detetada associação entre estas variáveis (Dezengrini et al., 2007; Chabchoub et al., 2008). Por sua vez, a presença de anticorpos não estava associada ao género. Apesar de existirem investigações que estão de acordo com este resultado (Yang et al., 2010), outros autores verificaram que existia uma maior proporção de machos seropositivos em determinadas populações, atribuindo esse facto às diferenças comportamentais entre os dois géneros, embora fosse um fator questionável (Dezengrini et al., 2007; Chabchoub et al., 2008).

A evolução progressiva do CPV-2 deu origem ao aparecimento de três variantes antigénicas, 2a, 2b e 2c, com diferentes propriedades da estirpe original, apresentando também a capacidade de se replicarem nos gatos. Existem publicações que descrevem a evidência de doença clínica em gatos infetados por estas estirpes, manifestando sinais característicos de uma infeção por FPV (Decaro et al., 2010a). No entanto, estudos recentes evidenciaram uma elevada prevalência destas variantes em populações de gatos clinicamente saudáveis (Clegg et al., 2012). Ainda assim, alguns destes animais eliminaram o vírus até seis semanas após infeção, o que torna os gatos num reservatório importante do CPV. No nosso caso particular, os gatos de Vila de Maio também poderão contribuir para a manutenção e disseminação do vírus. Apesar da prevalência das diferentes variantes do CPV não ser conhecida no arquipélago de Cabo Verde, provavelmente estas encontram-se aí presentes, não só devido à própria evolução do vírus, como também ao possível transporte do mesmo através de pessoas, mercadorias e animais contaminados. Tendo em conta a elevada taxa de substituição nucleotídica do CPV, semelhante à dos vírus RNA (Shackleton et al., 2005), seria importante monitorizar os genótipos presentes na nossa população, não só para averiguar e comparar a distribuição das variantes presentes neste local com outras investigações efectuadas, mas também para tentar compreender melhor o padrão evolutivo do vírus. Apesar de haver uma divergência de opiniões em relação à virulência das variantes do CPV-2, não existe evidência de que estas apresentem diferenças significativas neste aspeto. Possivelmente, as três estirpes apresentam um potencial patogénico semelhante, que pode aumentar dependendo das características de cada situação, incluindo o estado imunológico, idade, fatores de stress etc. Contudo, face à suspeita de que as diferenças antigénicas entre a estirpe original CPV-2 e os seus genótipos podem conduzir a um decréscimo da eficácia das vacinas atuais, deverá ser feita uma revisão dos programas de vacinação que vise o desenvolvimento de novas vacinas baseadas nas variantes do vírus.

5.2 CDV

Relativamente à recolha de amostras do ano de 2010, a prevalência de CDV detetada por *real-time* PCR foi de 11,3%. Já em 2011 não se registou nenhuma amostra positiva a este vírus. Curiosamente, 51,1% das amostras de sangue deste ano evidenciaram a presença de anticorpos contra o CDV.

Tal como no caso do CPV, a maior parte da literatura científica relativa a estudos epidemiológicos do CDV centra-se essencialmente na seroprevalência dos animais. Dezengrini et al. (2007) testou a presença de anticorpos contra o CDV nos 817 cães não-vacinados de bairros de Santa Maria, registando uma prevalência de 22,7%. Num estudo realizado na Argentina, Calderón et al. (2007) testou 99 amostras de sangue de cães domésticos vacinados e não vacinados através de RT-PCR, detetando uma prevalência de 73,8%. No entanto, 71,2% dos cães eram vacinados. É de notar que 89% dos cães vacinados apresentavam sinais característicos de esgana, o que, de acordo com este autor, se poderia dever ao aparecimento de novas variantes virais ou que os animais poderiam ter sido indevidamente vacinados. No estudo efetuado por Hass et al. (2008) referido anteriormente, mediram-se também os níveis de anticorpos contra este vírus nos mesmos 132 cães (vacinados e não-vacinados), registando-se uma prevalência de 58,3%. Contudo, a maioria dos cães vacinados (60,4%) não apresentava anticorpos ou o seu título era baixo. Os autores sugeriram que poderia ter havido uma falha na indução de imunidade devido à interferência com anticorpos maternos, caso a vacinação tivesse sido efetuada quando os animais eram muito jovens. Por outro lado, a imunização poderia ter sido realizada em animais com um sistema imunológico debilitado. Também o maneio inadequado das vacinas poderia alterar a sua eficácia e estas também podem apresentar diferentes capacidades imunogénicas. Curiosamente, 31,8% dos cães não vacinados e 46,6% dos com histórico desconhecido de vacinação apresentavam títulos protetores de anticorpos, o que sugere ocorrência de imunização devido à exposição natural. Na Tunísia, Chabchoub et al. (2008) obtiveram uma seroprevalência mais baixa. Estes autores verificaram que em 102 cães não-vacinados apenas 4 (3,9%) possuíam anticorpos anti-CDV. No estudo realizado na ilha Isabella, nas Galápagos, Levy et al. (2008) demonstrou uma seroprevalência de CDV de 22% em 95 cães, apesar de ser proibida a vacinação assim como o transporte de animais entre as ilhas e o continente. Entre 2005 e 2007, Acosta-Jamet et al. (2011) efetuou na região de Coquimbo, Chile, uma recolha de sangue apenas em cães domésticos não vacinados das cidades de Coquimbo e Ovalle e de zonas rurais adjacentes. Verificou-se que em 177 cães das zonas urbanas, a seroprevalência era cerca de 72%, enquanto que nas zonas rurais, num total de 215 animais, esta prevalência era inferior com um valor de aproximadamente 46%. Deve-se salientar que a maior parte dos donos dos cães das cidades permitiam a saída dos animais de suas casas e reparavam que existiam tanto cães

dos vizinhos como cães errantes nas imediações, o que sugere uma elevada densidade e frequência de contacto entre os animais.

No presente trabalho, a ausência de excreção do CDV verificada de 2010 para 2011 pode dever-se a vários fatores. Por um lado, devido ao facto de o CDV apresentar uma baixa resistência ambiental, existe a possibilidade do vírus não resistir às temperaturas altas de Cabo Verde que ocorrem durante o verão, ocorrendo uma menor exposição através do ambiente (Chabchoub et al., 2008; Lechner et al., 2010). Aliado à fragilidade do vírus, as elevadas taxas de mortalidade provocadas pelo CDV contribuem para a fraca difusão do vírus nas populações caninas. Por outro lado, a densidade de cães desta cidade é inferior quando comparada com aquela de cidades de maiores dimensões, logo as taxas de contacto entre animais serão menores, pelo que a manutenção e disseminação do vírus é consequentemente menor (Acosta-Jamet et al., 2011). Tendo isto em conta, existe a possibilidade de que uma percentagem considerável dos cães de Vila do Maio, que contactou anteriormente com o vírus, possua um título de anticorpos protetor e não se encontre a excretar. Os animais infetados que sobreviveram desenvolveram uma resposta imunitária, funcionando como um possível estímulo vacinal/infecioso para os outros. Por sua vez, os animais que sucumbiram à infeção deixaram de excretar o vírus.

Comparando com os estudos anteriores, os resultados serológicos obtidos podem ser em parte explicados pelo facto de a grande maioria dos cães de Vila do Maio não ser vacinada; a partir dos registos efetuados, em 125 cães apenas 2 eram vacinados. Assim, a seroprevalência registada é inferior comparativamente àquelas obtidas em locais onde existe uma vacinação frequente ou em populações parcialmente vacinadas. Sendo baixa a taxa de vacinação, o facto de 51,1% dos animais apresentar anticorpos e de se verificar uma tendência crescente de animais seropositivos com o aumento da idade, pode estar relacionado com um possível surto de CDV que tenha ocorrido anteriormente na população, devido ao aumento de exposição ao vírus com a idade. Apesar de não ser estatisticamente significativo, a seroprevalência superior nos cães mais velhos está de acordo com os resultados obtidos noutras investigações (Dezengrini et al., 2007; Acosta-Jamet et al., 2011). Similarmente a outros estudos e tal como no caso do CPV, a presença de anticorpos anti-CDV não estava associada ao género, sendo este um fator igualmente controverso e questionável no caso deste vírus (Dezengrini et al., 2007).

Foi possível constatar que todos os animais seropositivos ao CDV (51,1%) possuíam um título de anticorpos protetor, com base no estudo realizado por Twark e Dodds (2000). Apesar de 96% dos animais deste grupo apresentar títulos de anticorpos baixos, Schultz et al. (2010) defendem que em cães ativamente imunizados, quer de forma natural quer através de vacinação, o título de anticorpos não é muito relevante, desde que este seja detetável. Apenas no caso dos cachorros não vacinados que ainda possuem anticorpos maternos (imunidade passiva), o título de anticorpos é importante. Animais ativamente

imunizados encontram-se protegidos contra a infeção e doença, uma vez que irão desenvolver uma resposta humoral e celular rápida num segundo contacto com o vírus. Em casos onde o título de anticorpos seja baixo ou se encontre em concentrações não detetáveis, a resposta rápida e eficiente desenvolvida pelas células de memória pode ser suficiente para prevenir o desenvolvimento de doença clínica (Tizard & Ni, 1998). De facto, os “títulos protetores” são baseados em investigações em que as doses utilizadas para infeção experimental de animais são possivelmente muito superiores às aquelas encontradas em condições normais. Nesse caso, cães que tenham sucumbido à infeção experimental poderiam eventualmente ter imunidade suficiente para resistir a uma infeção natural (Litster, Nichols & Volpe, 2012). Embora o teste de ELISA apresente boa sensibilidade e especificidade, seria recomendável testar as amostras através do teste de seroneutralização, para confirmação da presença e título de anticorpos neutralizantes.

As publicações científicas dos últimos anos revelam um aumento da incidência de esgana, inclusive nas populações de cães domésticos vacinados. Face à elevada mutabilidade do CDV, muitos autores defendem que a circulação de diferentes estirpes do vírus pode ser responsável por estas falhas de vacinação, sugerindo que a variação genética do gene H poderá permitir ao vírus evitar a resposta imunitária gerada pelas estirpes atualmente utilizadas no fabrico de vacinas (Zhao et al., 2010; Panzera et al., 2012). Para além disso, suspeita-se ainda que estas diferenças antigénicas poderão contribuir para o alargamento do espectro de hospedeiros que este vírus infeta (Zhao et al., 2010). Embora o impacto da heterogeneidade genética/antigénica não seja clara, a recolha de informação sobre a sequenciação do CDV é útil para a compreensão da epidemiologia e ecologia do vírus. Apesar da grande maioria desta população não ser vacinada, seria interessante realizar a genotipagem de CDV presente nas amostras, para diferenciação entre estirpes vacinais e estirpes de campo, e averiguar a distribuição das diferentes linhagens nesta ilha.

5.3 CCoV

Contrariamente aos vírus anteriores, no caso do CCoV as amostras apenas foram testadas através de *real-time* PCR. A baixa prevalência obtida nos dois anos foi muito semelhante: 1,9% em 2010 e 1,1% em 2011.

Apesar da crescente importância do CCoV como agente patogénico dos cães, a sua distribuição mundial não é ainda muito conhecida. Existem poucos estudos recentes sobre a prevalência deste vírus em populações comparáveis à do presente trabalho. Como foi referido anteriormente, nos últimos anos a maioria das investigações centra-se principalmente na prevalência deste vírus em cães com diarreia provenientes de canis, centros de recolha de animais ou clínicas, com vista à caracterização genética viral aí presente (Ntafis, Mari, Danika, Fragkiadaki & Buonavoglia, 2010; Soma et al., 2011; Stavisky et al., 2012).

Numa investigação efetuada num canil do Reino Unido, este vírus foi isolado em 45% das amostras fecais colhidas a partir de cães com e sem diarreia, mas a seroprevalência obtida foi de 76% (Tennant, Gaskell, Jones & Gaskell, 1993). No Japão, Bandai et al. (1999) testaram a presença de anticorpos neutralizantes em 467 cães provenientes de abrigos para animais e a prevalência foi de 44,1%. No mesmo estudo, analisaram ainda 100 zaragatoas retais de cães com diarreia através de RT-PCR e detetaram o vírus em 16% das amostras. Um extenso rastreio serológico foi realizado por Naylor et al. (2001), onde testaram a presença anticorpos em amostras de sangue de diferentes grupos de cães da Austrália. Num total de 1396 amostras, 40,8% dos animais provenientes de canis possuíam anticorpos anti-CCoV, enquanto que em apenas 15,8% de cães domésticos que contactavam com o exterior se verificaram estes anticorpos. No estudo efetuado por Dezengrini et al. (2007) em Santa Maria, Brasil, verificaram que 50,4% dos animais eram positivos a anticorpos contra o CCoV. Entre 2003 e 2004, Ahn, Jeoung, Pak e Kim (2007) testaram a presença de anticorpos contra este vírus em 817 cães adultos saudáveis de diferentes províncias da Coreia e obtiveram uma seroprevalência de 87,9%, o que significa que o CCoV se encontra bastante disseminado neste país. Na ilha Isabella, nas Galápagos, nenhuma das 95 amostras testadas por Levy et al. (2008) era seropositiva ao CCoV. Na Alemanha, Schulz, Strauch, Mueller, Eichhorn e Hartmann (2008) registaram uma prevalência de 17,5% em 200 cães saudáveis através de microscopia eletrónica. Num centro de recolha de cães, Erles & Brownlie (2009) investigaram a eliminação deste vírus a partir de amostras fecais de 40 animais através de RT-PCR e a prevalência obtida foi de 17,5%. Nenhum dos cães apresentava sinais de doença entérica o que indicou a presença de infeções subclínicas na população. Mais recentemente, no sul do Brasil, Castro et al. (2010) analisaram a seroprevalência do CCoV numa população de 121 cães: 22 eram não-vacinados, 69 tinham sido vacinados pelo menos uma vez e 30 possuíam histórico de vacinação desconhecido. Os anticorpos estavam presentes em 45,5% dos não-vacinados, 24,8% dos sem histórico de vacinação e 47,8% dos vacinados. Com base nos resultados, os autores sugeriram uma possível falha de vacinação. Num estudo realizado por Stavisky et al. (2010), recolheram-se aleatoriamente amostras fecais de 249 cães provenientes de diversas clínicas veterinárias de todo o Reino Unido para deteção do CCoV através de RT-PCR. Apesar do número de cães ser elevado, a prevalência obtida foi de apenas 2,8%. Estes autores referem que as diferenças observadas entre os diversos estudos efetuados podem depender de vários fatores incluindo os métodos de deteção utilizados assim como as características e estado de saúde das populações de cães em estudo. Mencionam ainda que a prevalência do CCoV numa população pode variar com o tempo e que depende do *timing* da colheita de amostras. Esta prevalência é também geralmente superior em cães com diarreia comparando com cães saudáveis (Stavisky et al., 2012). Soma et al. (2011) avaliaram a presença de RNA deste vírus a partir de 109 amostras fecais de cães diarreicos provenientes de várias

clínicas do Japão e verificaram que a prevalência nos cães com menos de 1 ano era significativamente superior relativamente aos cães com idades superiores a 1 ano (66,3% e 6,9%, respetivamente), indicando que esta infeção pode ser uma importante causa de diarreia nos cães mais jovens. No estudo efectuado por Decaro et al. (2011) referido anteriormente, os autores testaram também a presença de CCoV nas 156 amostras fecais provenientes de cães diarreicos de vários países da Europa, obtendo uma prevalência média de 38,5%. Na Irlanda, McElligot et al. (2011) obtiveram uma prevalência de CCoV semelhante à registada no nosso trabalho. Estes autores testaram a presença do vírus em 250 amostras fecais através de RT-PCR e apenas 3 eram positivas (1,2%). Os cães envolvidos no estudo eram provenientes de várias regiões do país e incluíam animais vacinados e não vacinados assim como sintomáticos e assintomáticos.

Apesar dos mecanismos epidemiológicos do CCoV serem pouco conhecidos, a investigação efectuada ao longo dos últimos 20 anos sugere que o ambiente proporcionado pelos canis pode ser fundamental na manutenção desta infeção nas populações caninas. Tendo em conta as características da nossa população de cães, os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com aqueles registados em alguns estudos. A baixa prevalência que se verificou nos cães errantes de Vila do Maio entre 2010 e 2011 significa que o vírus se encontra a circular em baixas concentrações nesta região, o que se pode dever à baixa estabilidade do vírus em condições ambientais normais ou também ao reduzido número de partículas virais nas fezes no momento da colheita. À semelhança do que ocorre com o CPV, cães recuperados de uma infeção por CCoV podem funcionar como reservatórios assintomáticos e excretar o vírus periodicamente, o que resulta numa persistência e circulação contínua do mesmo no ambiente.

Caso se analisasse a seroprevalência das amostras, os resultados poderiam não ser fidedignos, uma vez que os testes serológicos são baseados na identificação de anticorpos contra o CCoV-II, sendo desconhecida a sua eficácia na deteção de anticorpos anti-CCoV-I (Stavisky et al., 2010). Para além disso, o decréscimo de anticorpos anti-CCoV parece ser muito rápido (Zarnke et al., 2001), sendo questionável a utilidade destes métodos.

Como a percentagem de animais com diarreia e a prevalência deste vírus foram muito baixas, não foi possível fazer uma associação estatística entre os dois parâmetros.

5.4 Agentes patogénicos e conservação da vida selvagem

Existe uma crescente consciencialização dos riscos associados à circulação de agentes patogénicos tanto em populações de animais domésticos como de animais selvagens. Nos últimos 20 anos, as doenças infecciosas foram responsáveis pela diminuição do tamanho de diversas populações de espécies silváticas, conduzindo em alguns casos quase à sua extinção. Estas situações têm sido registadas em vários continentes como África, Ásia, Europa e América do Norte, dada a extensa investigação que é realizada nestes locais.

Atualmente, o elevado número e densidade de animais domésticos que se verificam em todo mundo fornecem condições ótimas para a manutenção de agentes virais nas populações. Consequentemente, estas podem funcionar como reservatórios de doenças, atuando como fonte de infecção para as espécies selvagens.

O estudo desenvolvido por Acosta-Jamet et al. (2011) é um dos exemplos que ilustra o risco de infecção associado à interação entre espécies domésticas e selvagens. Entre 2005 e 2007, estes autores efetuaram na região de Coquimbo, Chile, uma recolha de sangue a cães domésticos não vacinados das cidades de Coquimbo e Ovalle e de zonas rurais adjacentes, assim como a raposas erráticas destas últimas zonas, para testagem de anticorpos anti-CDV. A maior parte dos donos dos cães das cidades permitia a saída dos animais de suas casas e estes contactavam tanto com cães dos vizinhos como com cães errantes das imediações, o que sugere uma elevada densidade e frequência de contacto entre os animais nestas zonas. A seroprevalência do CDV nos cães domésticos foi superior nos cães das zonas urbanas (72%) em relação às zonas rurais (43%). Por sua vez, a seroprevalência nas raposas foi semelhante à observada nas zonas rurais e era superior nas áreas mais próximas de populações humanas. Os autores sugeriram que os cães das áreas urbanas eram os responsáveis pela infecção dos animais selvagens e dos cães das zonas rurais. Como o tamanho destas duas últimas populações era inferior ao necessário para manter o CDV nesses locais, os cães domésticos das cidades atuavam como fonte de infecção para estes animais, possivelmente através de contactos esporádicos. Na Alemanha, Frölich et al. (2005) efetuaram um estudo similar. A partir da deteção de anticorpos contra o CPV em raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*), os autores averiguaram se a prevalência de animais positivos estava associada à proximidade das zonas urbanas e rurais e verificaram que na periferia de Berlim a proporção de animais seropositivos era muito elevada. Com base nestes resultados, o contacto entre cães domésticos da cidade e as raposas estaria provavelmente na origem desta situação. No sul do Brasil, Hübner et al. (2010) encontraram anticorpos contra CPV, CDV e CCoV em raposas-das-pampas (*Pseudalopex gymnocercus*) e raposas-caranguejeiras (*Cerdocyon thous*), numa região associada à produção agrícola onde existia a possibilidade de contacto entre estes animais e os cães domésticos desse local.

Situações como estas podem colocar em perigo a conservação de espécies selvagens. Em 1999, ocorreu uma catastrófica diminuição da população de raposas da ilha de Santa Catalina na Califórnia, Estados Unidos da América, devido a um possível surto de CDV (Timm et al., 2009). A introdução de guaxinins (*Procyon lotor*) portadores do vírus na ilha poderá ter estado na origem da morte de 95% destas raposas. Por sua vez, os cães domésticos que viviam na ilha poderão ter contribuído para a disseminação da doença. Este exemplo revela também a vulnerabilidade das populações carnívoras insulares à introdução de agentes infecciosos nesses locais.

Em África, a circulação do CDV entre diferentes espécies encontra-se bem documentada. A título de exemplo, entre 1989 e 1991, foi realizado um estudo longitudinal a norte da Reserva Natural de Masai Mara (Alexander & Appel, 1994). Nos anos de 1989 e 1990, os autores obtiveram uma baixa seroprevalência a CDV nessa região a partir da colheita de amostras de cães domésticos e nenhum cão selvagem africano (*Lycaon pictus*) testado na mesma área revelou anticorpos contra o vírus. Contudo, em 1991, a seroprevalência nos cães aumentou substancialmente de 1% para 76% e os sinais clínicos manifestados pelos animais doentes eram concordantes com uma infeção pelo CDV. Simultaneamente, as populações de cães selvagens daquela zona desapareceram. Não foi possível estabelecer uma relação causal entre o CDV e o desaparecimento das populações de cães selvagens, uma vez que não se encontraram cadáveres dos mesmos, não se conhecendo também até que ponto o vírus da raiva, que era endémico naquela área, poderá ter contribuído para a morte dos animais. No entanto, tornou-se evidente a importância da monitorização de espécies domésticas em contacto próximo com animais selvagens. Em 1994, um dos surtos de CDV mais conhecidos ocorreu no Parque Nacional do Serengeti, Tanzânia, onde uma população de leões sofreu uma elevada mortalidade possivelmente causada pelo CDV (Roelke-Parker et al., 1996). O vírus isolado a partir destes animais apresentava uma relação filogenética muito próxima daquela verificada em cães domésticos da região. Estudos posteriores demonstraram que a morte dos leões não estaria exclusivamente associada a uma epidemia de CDV (Munson et al., 2008). Análises serológicas indicaram que pelo menos cinco surtos “silenciosos” do vírus ocorreram na mesma população de leões entre 1976 e 2006, sem que se verificassem sinais clínicos ou mortalidades significativas. Estes autores constataram que durante a epidemia de 1994 houve períodos de seca extrema associados a uma diminuição do número de herbívoros e a um aumento do número de infestações por carraças infetadas por *Babesia* tanto nos herbívoros como nos leões. Como consequência, a infeção dos leões por estes hemoparasitas foi ampliada pelo efeito imunossupressor do CDV, conduzindo a elevadas mortalidades. Em 2007, Goller et al. (2010) investigaram as causas de morte de seis cães selvagens africanos pertencentes a uma matilha que se encontrava próxima do Parque Nacional do Serengeti e os animais eram claramente positivos a anticorpos contra o CDV. Estes autores verificaram também a presença de infeções concomitantes com outros microrganismos (CPV, *Streptococcus equi* subsp. *Ruminantium* e *Hepatozoon* sp.). Apesar de não saberem a razão pela qual alguns cães selvagens sobreviviam enquanto outros sucumbiam à infeção pelo CDV, os autores sugeriram que tanto o nível de imunidade natural dos animais como as infeções simultâneas com outros agentes patogénicos podem ser determinantes para o impacto do vírus. Mais recentemente, Prager et al. (2012) determinou a presença e prevalência do vírus da raiva, CDV, CPV, CCoV e *Babesia* em populações de cães selvagens africanos, provenientes de 16 regiões da África Subsariana. Cada região foi classificada em três categorias diferentes:

áreas “protegidas-cercadas”, áreas “protegidas-não-cercadas” e áreas desprotegidas. Em cada uma destas zonas esperavam-se probabilidades baixas, moderadas e altas de contacto com cães domésticos, respetivamente. Os resultados demonstraram que a prevalência de CDV nos cães selvagens era significativamente alta tanto nas áreas protegidas-não-cercadas como nas desprotegidas, enquanto que a exposição ao vírus da raiva e ao CCoV era elevada apenas nas áreas desprotegidas, o que sugere que existem outros fatores para além do contacto direto com cães domésticos que influenciam a transmissão do CDV aos cães selvagens. Eventualmente, as áreas protegidas-não-cercadas possuíam uma densidade de carnívoros selvagens suficientemente elevada para manter o vírus na população, ou seja, superior ao *critical community size* (CCS). Deste modo, a combinação entre uma população de carnívoros selvagens considerável e níveis de contacto moderados com populações de cães domésticos pouco densas pode ser suficiente para constituir uma comunidade multi-carnívora cuja população seja superior ao CCS, permitindo a manutenção do CDV nesse local. (Alexander et al., 2010; Prager et al., 2012). Contudo, outros autores sugerem que mesmo em populações com um número inferior ao CCS, se estiverem epidemiológica e espacialmente conectadas com outras populações com um número superior ou inferior ao CCS, podem formar uma complexa meta-população onde este agente pode persistir a longo prazo. (Almberg, Cross & Smith, 2010). Em contraste com os agentes infecciosos de transmissão direta (CDV, CCoV e vírus da raiva), como o CPV persiste no ambiente durante longos períodos de tempo, o CCS necessário para a manutenção do vírus é muito baixo ou inexistente. Isto pode explicar o facto da exposição a este vírus ser igualmente elevada nas três categorias de áreas. Prager et al. (2012) sugeriram que a prevenção da manutenção do vírus da raiva e do CCoV passaria pela vacinação dos cães domésticos enquanto que para prevenir o CDV e CPV a vacinação dos próprios cães selvagens deveria ser equacionada. É necessária uma maior investigação para determinar a persistência e impacto destes agentes a longo prazo nas populações presentes nos ecossistemas africanos e compreender o seu papel na mortalidade dos animais.

Na Europa, vários surtos de CDV têm afetado as populações de carnívoros selvagens dos Alpes, no nordeste de Itália (Monne et al., 2011). Vários texugos, raposas e uma fuinha foram encontrados mortos ou revelavam sinais neurológicos e respiratórios, sendo positivos à infeção por este vírus. Os autores detetaram o aparecimento de um grupo genético não registado em estudos anteriores nesta região, mas que tinha sido identificado noutras zonas da Europa, nomeadamente sul da Alemanha e Hungria, sugerindo que a sua disseminação nos Alpes se poderia dever principalmente ao movimento de outros carnívoros selvagens da Europa Central e de Leste ou, com menor probabilidade, devido ao transporte legal e ilegal de cães para esta zona. Por sua vez, um aumento da concentração de hospedeiros na região dos Alpes poderia estar na origem da eficácia de transmissão do CDV. O

aparecimento de novas estirpes pode constituir um risco de infecção de espécies em perigo de extinção, não só pela possibilidade de afetarem um maior número de hospedeiros assim como pelo facto destas populações nunca terem contactado com as mesmas. Um exemplo de uma espécie ameaçada é o lince Ibérico, originário da nossa península; atualmente, este é o felino selvagem em maior perigo de extinção. Em Espanha, Meli et al. (2010) detetaram, através de RT-PCR, grandes quantidades de RNA de CDV em órgãos de um lince ibérico encontrado morto no Parque Nacional de Doñana, o que indica que este vírus pode constituir uma ameaça para esta espécie. Face à possibilidade de acesso de cães domésticos às áreas habitadas pelos lincos de Doñana, os autores sugeriram a hipótese de vacinação destes animais ou, idealmente, a vacinação oral dos lincos com uma vacina recombinante. Ainda em Espanha, Sobrino et al. (2008) constatou que as populações de raposas e lobos deste país apresentavam anticorpos contra o CDV e que o CPV era endémico nos lobos. No nosso país, um estudo serológico demonstrou também uma extensa exposição de CDV e CPV em carnívoros silvestres, incluindo lobos, raposas, lincos, ginetas e fuinhas (Santos, Almendra & Tavares, 2009). Na Escandinávia, existe também evidência de que o CDV se encontra a circular nas populações de raposas vermelhas e lobos assim como nas raposas-do-ártico de Svalbard (Akerstedt et al., 2010).

Nos Estados Unidos, Mech, Goyal, Paul e Newton (2008) demonstraram que o CPV afetou a taxa de crescimento da população de lobos de Minnesota, com base em correlações entre a seroprevalência deste vírus, sobrevivência das crias e alterações no número de animais, através de um estudo efetuado num período de 30 anos. Tendo em conta a elevada seroprevalência obtida e a diminuição do número de crias da população ao longo dos anos, os autores sugeriram que os animais mais jovens seriam mais suscetíveis ao vírus, colocando em causa as taxas de recolozinação dessa região. No Canadá, Nelson et al. (2012) testaram a presença de anticorpos contra CPV e CDV em 99 lobos dos Parques Nacionais de Banff e Jasper e áreas circundantes das Montanhas Rochosas do Canadá e obtiveram uma seroprevalência de 95% e 24%, respetivamente. A elevada prevalência de anticorpos contra o CPV na fauna selvagem indica que podem ocorrer infeções cruzadas, apontando para um aumento da diversificação dos hospedeiros suscetíveis ao vírus.

A prevalência do CDV também tem sido investigada no Japão. Neste país, os guaxinins encontram-se largamente distribuídos e o seu número tem vindo a aumentar. Nakano et al. (2009) demonstrou que possivelmente esta espécie tem contribuído para a disseminação do CDV nesta ilha, colocando em risco outros animais silváticos. Mais recentemente, ocorreu um surto deste vírus em Tanabe, e anticorpos foram detetados em vários mamíferos selvagens, incluindo javalis (*Sus scrofa*) e veados japoneses (*Cervus nippon*) (Kameo et al., 2012). Sendo este o primeiro registo de epizootia do CDV nesta região, os autores suspeitaram que o vírus tivesse sido transportado por outras espécies selvagens ou ainda por cães domésticos da cidade, apesar destes serem frequentemente vacinados.

Novamente, salienta-se a importância da monitorização deste vírus tanto nas espécies domésticas como nas não-domésticas, sendo necessário clarificar o espectro de hospedeiros do mesmo e melhorar a eficácia das vacinas.

Nas últimas três décadas, o CDV demonstrou ter capacidade de infetar diferentes espécies. Em 1987, este vírus foi responsável pela morte de um número significativo de focas (*Phoca sibirica*) no lago Baikal, tendo sido denominado originalmente de vírus da esgana das focas do tipo 2 (PDV-2), diferente do vírus que no ano seguinte causou a morte de cerca de 23000 focas da espécie *Phoca vitulina* a noroeste da Europa, designado vírus da esgana das focas do tipo 1 (PDV-1) (Visser et al., 1990). Mamaev et al. (1995) suspeitou que o contacto entre as focas do lago Baikal e carnívoros terrestres infetados pelo CDV estivesse na origem desta epizootia. Recentemente, Butina et al. (2010) descobriram que a linhagem *Arctic-like* do CDV, responsável pelo surto de 1987, tem circulado no lago Baikal desde essa altura até hoje, existindo uma elevada probabilidade de num futuro próximo ocorrerem mais episódios como este, tanto em focas como noutros animais selvagens, sendo necessário um estudo contínuo da epidemiologia do CDV nestas espécies. Outra espécie suscetível de infeção por este vírus corresponde ao macaco-rhesus (*Macaca mulatta*). Em 2008, na China, um surto de CDV afetou 20 destes animais em cativeiro que apresentavam sinais característicos de esgana (Sun et al., 2010). Apesar do tratamento, 12 animais sucumbiram à infeção, o que pode indicar um aumento da virulência do CDV nesta espécie. No mesmo país, Qiu et al. (2011) registaram também vários surtos do vírus em macacos-rhesus de uma exploração que compreendia 31260 animais. Aproximadamente 10000 animais estavam infetados e 4250 acabaram por morrer. Os autores sugeriram que o CDV deveria ser monitorizado não só nos macacos mas também nos tratadores, para prevenir uma possível transmissão entre espécies face à alteração imprevisível do vírus.

Infelizmente, a falta de informação sobre a vida selvagem presente na ilha do Maio não nos permite saber até que ponto a circulação de vírus na população canina da cidade de Vila do Maio pode constituir um perigo para esses animais. Ainda assim, sabe-se que existem animais como mangustos e alguns primatas não-humanos no arquipélago de Cabo Verde, que, apesar de não serem espécies ameaçadas, poderão ser suscetíveis a vírus como o CDV (Cawthon Lang, 2006; Hoffmann, 2008; Qiu et al. 2011).

Resumindo, os exemplos mencionados nesta discussão ilustram a importância da monitorização virológica, tanto nas espécies domésticas como nas selvagens. Apesar de existir uma maior evidência da influência do CDV na morte dos animais, estudos futuros deverão clarificar o impacto destes agentes na fauna selvagem e propor medidas preventivas adequadas.

6. Conclusão

Possivelmente, este é o primeiro rastreio virológico efetuado em populações caninas do arquipélago de Cabo Verde, fornecendo informação básica e importante sobre a dinâmica epidemiológica dos vírus na ilha do Maio.

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que o CPV, CDV e CCoV se encontram a circular na população canina errante de Vila do Maio em diferentes prevalências. Como aparentemente a taxa de vacinação nesta cidade é baixa, o contacto entre os vírus e esta população pode conduzir à mortalidade de um elevado número de animais, principalmente devido ao CPV e CDV.

A presença de animais suscetíveis, a elevada frequência de infeções, o período prolongado de excreção viral e persistência ambiental destes agentes, particularmente do CPV, contribuem para a contínua circulação dos mesmos nesta população. Assim, o conhecimento da prevalência e da distribuição espacial dos vírus circulantes e dos fatores de risco associados às infeções podem auxiliar no planeamento de estratégias de controlo. A implementação de um programa de vacinação poderia contribuir para um aumento da imunidade desta população de cães, reduzindo a circulação viral e, consequentemente, das respetivas doenças, assim como diminuir a suscetibilidade desta população a um surto futuro.

Devido ao vasto leque de hospedeiros suscetíveis ao CPV e ao CDV (lobos, raposas, guaxinins, mangustos, doninhas, furões, visons, texugos), seria importante a identificação da fauna silvestre susceptível existente na ilha do Maio, para avaliar o potencial risco de infeção destes animais.

Bibliografia

- Acosta-Jamett, G., Chalmers, W.S., Cunningham, A.A., Cleaveland, S., Handel, I.G., Bronsvoort, B.M. (2011). Urban domestic dog populations as a source of canine distemper virus for wild carnivores in the Coquimbo region of Chile. *Veterinary Microbiology*, 152(3-4), 247-257.
- Ahn, S., Jeoung, S., Pak, S., Kim, D. (2007). Serological survey for canine coronavirus in adult dogs. *Journal of Veterinary Clinics*, 24(4), 493-498.
- Akerstedt, J., Lillehaug A., Larsen I. L., Eide, N. E., Arnemo, J. M., Handeland, K. (2010). Serosurvey for canine distemper virus, canine adenovirus, *Leptospira interrogans*, and *Toxoplasma gondii* in free-ranging canids in Scandinavia and Svalbard. *Journal of Wildlife Diseases*, 46, 474–480.
- Alexander, K., & Appel, M. (1994). African wild dogs (*Lycaon pictus*) endangered by a canine distemper epizootic among domestic dogs near the Masai Mara National Reserve, Kenya. *Journal of Wildlife Diseases*, 30(4), 481-485.
- Alexander, K.A., McNutt, J.W., Briggs, M.B., Standers, P.E., Funston, P., Hemson, G., Keet, D., van Vuuren, M. (2010). Multi-host pathogens and carnivore management in southern Africa. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 33, 249–265.
- Almberg, E.S., Cross, P.C. & Smith, D.W. (2010). Persistence of canine distemper virus in the Greater Yellowstone Ecosystem's carnivore community. *Ecological Applications*, 20, 2058–2074.
- An, D.J., Kim, T.Y., Song, D.S., Kang, B.K. & Park, B.K. (2008). An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper. *Journal of Virological Methods*, 147, 244–249.
- Appel, M.J.G., Scott, W.F. & Carmichael, L.E. (1979). Isolation and immunization studies of canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *The Veterinary Record*, 105, 156-159.
- Bandai, C., Ishiguro, S., Masuya, N., Hohdatsu, T., Mochizuki, M. (1999). Canine coronavirus infections in Japan: virological and epidemiological aspects. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61(7), 731–736.
- Barrett, T. (1999). Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Veterinary Microbiology*, 69(1-2), 3-13.
- Beineke, A., Puff, C., Seehusen, F., & Baumgartner, W. (2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127(1-2), 1-18.
- Binn, L.N., Lazar, E.C., Eddy, G.A. & Kajima, M. (1970). Recovery and characterization of a Minute Virus of Canines. *Infection and Immunity*, 1, 503-508.
- Binn, L. N., Lazar, E. C., Keenan, K. P., Huxsoll, D. L., Marchwicki, B. S., and Strano, A. J. (1974). Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. *Proceedings of the 78th Annual Meeting of the United States Animal Health Association*, 78, 359–366.

-
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA *Nucleic Acids. Research* 7, 6, 1513-1523.
- Blancou, J. (2004). Dog distemper: imported into Europe from South America? *Historia Medicinae Veterinariae*, 29(2), 35-41.
- Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N., Carmichael, L.E. (2001). Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *Journal of General Virology*, 82, 1555–1560.
- Buonavoglia, C., Decaro, N., Martella, V., Elia, G., Campolo, M., Desario, C., Castagnaro, M., Tempesta, M. (2006). Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 492–494.
- Butina, T. V., Denikina, N. N. & Belikov, S. I. (2010). Canine distemper virus diversity in Lake Baikal seal (*Phoca sibirica*) population. *Veterinary Microbiology*, 144, 192–197.
- Calderón, M. G., Remorini, P., Periolo, O., Iglesias, M., Mattion, N., & La Torre, J. (2007). Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Veterinary Microbiology*, 125(3-4), 341-349.
- Calderón, M.G., Mattion, N., Bucafusco, D., Fogel, F., Remorini, P., La Torre, J. (2009). Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. *Journal of Virological Methods*, 159, 141–145.
- Calderón, M.G., Romanutti, C., D' Antuono, A., Keller, L., Mattion, N., La Torre, J. (2011). Evolution of Canine Parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010: CPV2c has become the predominant variant affecting the domestic dog population. *Virus Research*, 157(1), 106-110.
- Carmichael, L. E., Schlafer D. H., Hashimoto A. (1994). Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6, 165-174.
- Carstens E. B. (2010). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Archives of Virology*, 155(1), 133–146.
- Castro, C.C., Johann, J. M., Finger, P. F., Nunes, C. F., Vargas, G., Geferson, F., Hübner S. (2010). Coronavirus canino (CCoV) em cães vacinados e não vacinados domiciliados em Pelotas, RS. *Ciências Agrárias*, 31(4), 995-1000.
- Cavalli, A., Bozzo, G., Decaro, N., Tinelli, A., Aliberti, A., Buonavoglia, D. (2001). Characterization of a canine parvovirus strain isolated from an adult dog. *The new microbiologica*, 24, 239–242.
- Cavalli, A., Martella, V., Desario, C., Camero, M., Bellacicco, A.L., De Palo, P., Decaro, N., Elia, G., Buonavoglia, C. (2008). Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15, 534–539.
- Cawthon Lang, K.A. (2006). *Primate Info Net*. Acedido em Maio 28, 2012, disponível em: <http://pin.primate.wisc.edu/factsheets/entry/vervet>
- Chabchoub, A., Hajjem, S., Calleja, C., Chalvet-Monfray, K., Landolsi, F., Incorvia, G., El Goulli, A., Artois, M., 2008. Parvovirose et maladie de Carré chez le chien : enquête
-

séro-épidémiologique dans le sud tunisien. *Revue De Medecine Veterinaire*, 159, 224–229.

Chappuis, G. (1995). Control of canine distemper. *Veterinary Microbiology*, 44, 351–358.

Clegg, S.R., Coyne, K.P., Dawson, S., Spibey, N., Gaskell, R.M., Radford, A.D. (2012). Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. *Veterinary Microbiology*, 157(1-2), 78–85.

de Haan, C.A., Vennema, H., Rottier, P.J. (2000). Assembly of the Coronavirus Envelope: Homotypic Interactions between the M Proteins. *Journal of Virology*, 74 (11), 4967–4978.

Decaro, N., Pratelli, A., Campolo, M., Elia, G., Martella, V., Tempesta, M., Buonavoglia, C., (2004). Quantitation of canine coronavirus RNA in the faeces of dogs by TaqMan RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 119, 145–150.

Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Desario, C., Campolo, M., Di Trani, L., Tarsitano, E., Tempesta, M., Buonavoglia, C. (2005a). A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 DNA in the feces of dogs. *Veterinary Microbiology*, 105, 19–28.

Decaro, N., Martella, V., Ricci, D., Elia, G., Desario, C., Campolo, M., Cavaliere, N., Di Trani, L., Tempesta, M., Buonavoglia, C. (2005b). Geno-type-specific fluorogenic RT-PCR assays for the detection and quantitation of canine coronavirus type I and type II RNA in faecal samples of dogs. *Journal of Virological Methods*, 130, 72–78.

Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Campolo, M., Desario, C., Camero, M., Cirone, F., Lorusso, E., Lucente, M.S., Narcisi, D., Scalia, P., Buonavoglia, C. (2006). Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *Journal of Virological Methods*, 133, 92–99.

Decaro, N., Desario, C., Addie, D. D., Martella, V., Vieira, M. J., Elia, G., et al. (2007a). Molecular Epidemiology of Canine Parvovirus, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 13(8).

Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Mari, V., Lucente, M.S., Cordioli, P., Colaianni, M.L., Martella, V., Buonavoglia, C. (2007b). Serological and molecular evidence that canine respiratory coronavirus is circulating in Italy. *Veterinary Microbiology*, 121, 225–230.

Decaro, N., Martella, V., Elia, G., Desario, C., Campolo, M., Lorusso, E., Colaianni, M.L., Lorusso, A., Buonavoglia, C. (2007c). Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. *Veterinary Microbiology*, 121, 39–44.

Decaro, N., Martella, V., Elia, G., Campolo, M., Desario, C., Cirone, F., Tempesta, M., Buonavoglia, C. (2007d). Molecular characterisation of the virulent canine coronavirus CB/05 strain. *Virus Research*, 125, 54–60.

Decaro, N., & Buonavoglia, C. (2008). An update on canine coronaviruses: Viral evolution and pathobiology. *Veterinary Microbiology*, 132(3-4), 221–234.

Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Mari, V., Lavazza, A., et al. (2008). Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *The New Microbiologica: Official Journal of the Italian Society for Medical, Odontoiatric, and Clinical Microbiology (SIMMOC)*, 31(1), 125–130.

-
- Decaro, N., Mari, V., Campolo, M., Lorusso, A., Camero, M., Elia, G., Martella, V., Cordioli, P., Enjuanes, L., Buonavoglia, C. (2009). Recombinant canine coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus of swine are circulating in dogs. *Journal of Virology*, 83, 1532–1537.
- Decaro, N., Buonavoglia, D., Desario, C., Amorisco, F., Colaianni, M.L., Parisi, A., Terio, V., Elia, G., Lucente, M.S., Cavalli, A., Martella, V., Buonavoglia, C. (2010a). Characterisation of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia. *Research in Veterinary Science*, 89, 275–278.
- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Campolo, M., Mari, V., Desario, C., Lucente, M.S., Lorusso, E., Kanellos, T., Gibbons, R.H., Buonavoglia, C. (2010b). Immunity after natural exposure to enteric canine coronavirus does not provide complete protection against infection with the new pantropic CB/05 strain. *Vaccine*, 28, 724–729.
- Decaro, N., Desario, C., Billi, M., Mari, V., Elia, G., Cavalli, A., Martella, V., Buonavoglia, C. (2011). Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. *The Veterinary Journal*, 187, 195–199.
- Decaro, N., Mari, V., von Reitzenstein, M., Lucente, M.S., Cirone, F., Elia, G., Martella, V., King, V.L., Di Bello, A., Varello, K., Zhang, S., Caramelli, M., Buonavoglia, C. (2012). A pantropic canine coronavirus genetically related to the prototype isolate CB/05. *Veterinary Microbiology*. [Epub].
- Deem, S. L., Spelman, L. H., Yates, R. A., & Montali, R. J. (2000). Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31(4), 441-451.
- Desario, C., Decaro, N., Campolo, M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Camero, M., Buonavoglia, C. (2005). Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *Journal of Virological Methods*, 121, 179–185.
- Dezengrini, R., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2007). Soroprevalência das infecções por parvovírus, adenovírus, coronavírus canino e pelo vírus da cinomose em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, 37(1).
- Elia, G., Decaro, N., Martella, V., Cirone, F., Lucente, M. S., Lorusso, E., et al. (2006). Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 136(1-2), 171-176.
- Erles, K., Toomey, C., Brooks, H.W., Brownlie, J., 2003. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology*, 310, 216–223.
- Erles, K., Brownlie, J., 2009. Sequence analysis of divergent canine coronavirus strains present in a UK dog population. *Virus Research*, 141, 21–25.
- Filipov, C., Decaro, N., Desario, C., Amorisco, F., Sciarretta, R., Buonavoglia, C. (2011). Canine parvovirus epidemiology in Bulgaria. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 152–154.
- Frisk, A. L., Konig, M., Moritz, A., & Baumgartner, W. (1999). Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluid from Dogs with Distemper. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3634- 3643.
-

-
- Frölich, K., Streich, W.J., Fickel, J., Jung, S., Truyen, U., Hentschke, J., Dedek, J., Prager, D., Latz, N. (2005). Epizootiologic investigations of parvovirus infections in free-ranging carnivores from Germany. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(1), 231-235.
- Gamoh, K., Senda, M., Inoue, Y., Itoh, O. (2005). Efficacy of an inactivated feline panleucopenia virus vaccine against a canine parvovirus isolated from a domestic cat. *Veterinary Record*, 157, 285–287.
- Goddard, A. & Leisewitz, A.L. (2010). Canine parvovirus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(6), 1041-53.
- Goller, K.V., Fyumagwa, R.D., Nikolin, V., East, M.L., Kilewo, M., Speck, S., Müller, T., Matzke, M., Wibbelt, G. (2010). Fatal canine distemper infection in a pack of African wild dogs in the Serengeti ecosystem, Tanzania. *Veterinary Microbiology*, 146, 245–252.
- Greene, C. E., & Appel, M. J. (2006). Canine Distemper. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Revised Reprint (3rd ed., pp. 25-40). St Louis, Missouri: Saunders.
- Haijema, B. J., Volders, H., & Rottier, P. J. M. (2004). Live, Attenuated Coronavirus Vaccines through the Directed Deletion of Group-Specific Genes Provide Protection against Feline Infectious Peritonitis. *Journal of Virology*, 78(8), 3863-3871.
- Hass, R., Johann, J.M., Caetano, C.F., Fischer, G., Vargas, G.D., Vidor, T., Hübner, S.O. (2008). Níveis de anticorpos contra o vírus da cinomose canina e o parvovírus canino em cães não vacinados e vacinados. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia*, 60(1), 270-274.
- Hoelzer, K. & Parrish, C.R. (2010). The emergence of parvoviruses of carnivores. *Veterinary Research*, 41(6):39.
- Hoffmann, M. (2008). *IUCN Red List of Threatened Species*. Acedido em Maio 28, 2012, disponível em: <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/41606/0>
- Hong, C., Decaro, N., Desario, C., Tanner, P., Pardo, M.C., Sanchez, S., Buonavoglia, C., Saliki, J.T. (2007). Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19, 535–539.
- Hübner, S., Pappen, F. G., Ruas, J. L., Vargas, G., Fischer, G., Vidor, T. (2010). Exposure of pampas fox (*Pseudalopex gymnocercus*) and crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from the Southern region of Brazil to Canine distemper virus (CDV), Canine parvovirus (CPV) and Canine coronavirus (CCoV). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(3), 593-597.
- Hueffer, K., Parker, J. S. L., Weichert, W. S., Geisel, R. E., Sgro, J., & Parrish, C. R. (2003). The Natural Host Range Shift and Subsequent Evolution of Canine Parvovirus Resulted from Virus-Specific Binding to the Canine Transferrin Receptor. *Journal of Virology*, 77(3), 1718–1726.
- Hueffer, K., & Parrish, C. R. (2003). Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), 392-398.
- Kameo, Y., Nagao, Y., Nishio, Y., Shimoda, H., Nakano, H., Suzuki, K., Une, Y., Sato, H., Shimojima, M., Maeda, K. (2012). Epizootic canine distemper virus infection among wild mammals. *Veterinary Microbiology*, 154, 222-229.
-

-
- Kapil, S., Cooper, E., Lamm, C., Murray, B., Rezabek, G., Johnston 3rd, L., Campbell, G., Johnson, B. (2007). Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 4044–4047.
- Lechner, E.S., Crawford, P.C., Levy, J.K., Edinboro, C.H., Dubovi, E.J. (2010). Prevalence of protective antibody titers for canine distemper virus and canine parvovirus in dogs entering a Florida animal shelter. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236, 1317–1321.
- Levy, J. K., Crawford, P. C., Lappin, M. R., Dubovi, E. J., Levy, M. G., Alleman, R., et al. (2008). Infectious diseases of dogs and cats on Isabela Island, Galapagos. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 22(1), 60-65.
- Litster, A., Nichols, J., Volpe, A. (2012). Prevalence of positive antibody test results for canine parvovirus (CPV) and canine distemper virus (CDV) and response to modified live vaccination against CPV and CDV in dogs entering animal shelters. *Veterinary Microbiology*, 157(1-2), 86-90.
- Lorusso, A., Decaro, N., Schellen, P., Rottier, P.J.M., Buonavoglia, C., Haijema, B.-J., de Groot, R.J. (2008). Gain, preservation, and loss of a group 1a coronavirus accessory glycoprotein. *Journal of Virology*, 82, 10312–10317.
- Mamaev, L.V., Denikina, N.N., Belikov, S.I., Volchkov, V.E., Visser, I.K.G., Flemming, M., Kai, C., Harder, T.C., Liess, B., Osterhaus, A.D.M.E., Barrett, T. (1995). Characterization of morbilliviruses isolated from Lake Baikal seals (*Phoca sibirica*). *Veterinary Microbiology*, 44, 251–259.
- Martella, V., Decaro, N., Buonavoglia, C. (2006). Evolution of CPV-2 and implication for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes*, 33, 11–13.
- Martella, V., Elia, G., Lucente, M. S., Decaro, N., Lorusso, E., Banyai, K., et al. (2007). Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Veterinary Microbiology*, 122(1-2), 32-42.
- Martella, V., Elia, G., Buonavoglia, C. (2008). Canine distemper virus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 38(4), 787-797.
- McCaw, D. L., & Hoskins, J. D. (2006). Canine Viral Enteritis. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat , Revised Reprint* (3rd ed., pp. 63-73). St Louis, Missouri: Saunders.
- McElligott, S., Collins, P.J., Sleator, R.D., Martella, V., Decaro, N., Buonavoglia, C., O'Shea, H. (2011). Detection and genetic characterization of canine parvoviruses and coronaviruses in southern Ireland. *Archives of virology*, 156(3), 495-503.
- Mech, L. D., Goyal, S. M., Paul, W. J., & Newton, W. E. (2008). Demographic effects of canine parvovirus on a free-ranging wolf population over 30 years. *Journal of Wildlife Diseases*, 44, 824–836.
- Meli, M.L., Simmler, P., Cattori, V., Martínez, F., Vargas, A., Palomares, F., López-Bao, J.V., Simón, M.A., López, G., León-Vizcaino, L., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H. (2010). Importance of canine distemper virus (CDV) infection in free-ranging Iberian lynxes (*Lynx pardinus*). *Veterinary Microbiology*, 146, 132–137.
-

-
- Monne, I., Fusaro, A., Valastro, V., Citterio, C., Dalla Pozza, M., Obber, F., Trevisiol, K., Cova, M., De Benedictis, P., Bregoli, M., Capua, I., Cattoli, G (2011). A distinct CDV genotype causing a major epidemic in Alpine wildlife. *Veterinary Microbiology*, 150, 63-69.
- Munson, L., Terio, K. A., Kock, R., Mlengeya, T., Roelke, M. E., Dubovi, E., et al. (2008). Climate Extremes Promote Fatal Co-Infections during Canine Distemper Epidemics in African Lions. *PLoS ONE*, 3(6), e2545.
- Muzyczka, N., Berns, K.I. (2001). Parvoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. (4th ed.). (pp. 2327–2359). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Nakamura, M., Tohya, Y., Miyazawa, T., Mochizuki, M., Phung, H. T. T., Nguyen, N. H., et al. (2004). A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Archives of virology*, 149(11), 2261-2269.
- Nakano, H., Kameo, Y., Sato, H., Mochizuki, M., Yokoyama, M., Uni, S., Shibasaki, T., Maeda, K. (2009). Detection of antibody to canine distemper virus in wild raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71, 1661–1663.
- Nandi, S., Chidri, S., Kumar, M., Chauhan, R.S. (2010). Occurrence of canine parvovirus type 2c in the dogs with haemorrhagic enteritis in India. *Research in Veterinary Science*, 88, 169–171.
- Naylor, M., Monckton, R., Lehrbach, P., & Deane, E. (2001). Canine coronavirus in Australian dogs. *Australian Veterinary Journal*, 79(2), 116-119.
- Nelson, B., Hebblewhite, M., Ezenwa, V., Shury, T., Merrill, E.H., Paquet, P.C., Schmiegelow, F., Seip, D., Skinner, G., Webb, N. (2012). Prevalence of antibodies to canine parvovirus and distemper virus in wolves in the Canadian Rocky Mountains. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(1), 68-76.
- Nikolin, V.M., Wibbelt, G., Michler, F.U., Wolf, P., East, M.L. (2012). Susceptibility of carnivore hosts to strains of canine distemper virus from distinct genetic lineages. *Veterinary Microbiology*, 156, 45-53.
- Nivy, R., Hahn, S., Perl, S., Karnieli, A., Karnieli, O., Aroch, I. (2011). A fatal outbreak of parvovirus infection: First detection of canine parvovirus type 2c in Israel and secondary *Escherichia coli* septicemia and meningoencephalitis. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 66(3), 96-102.
- Ntafis, V., Mari, V., Danika, S., Fragkiadaki, E. & Buonavoglia, C. (2010). An outbreak of Canine coronavirus in puppies in a Greek kennel. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, 320–323.
- Ntafis, V., Xylouri, E., Kalli, I., Desario, C., Mari, V., Decaro, N., Buonavoglia, C. (2010). Characterization of canine parvovirus 2 variants circulating in Greece. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, 737–740.
- Palermo, L.M., Hafenstein, S.L. & Parrish, C.R. (2006). Purified feline and canine transferring receptors reveal complex interactions with the capsids of canine and feline parvoviruses that correspond to their host ranges. *Journal of Virology*, 80, 8482-8492.
- Panzer, Y., Calderón, M.G., Sarute, N., Guasco, S., Cardeillac, A., Bonilla, B., Hernández, M., Francia, L., Bedó, G., La Torre, J., Pérez, R. (2012). Evidence of two co-

-
- circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus Research*, 163(1), 401-404.
- Pardo, I.D., Johnson, G.C., Kleiboeker, S.B. (2005). Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5009–5017.
- Park, J.S., Choi, B.K., Vijayachandran, L.S., Ayyappan, V., Chong, C., Lee, K., Kim, S.C. & Choi, C.W. (2007). Immunodetection of canine parvovirus (CPV) in clinical samples by polyclonal antisera against CPV-VP2 protein expressed in *Escherichia coli* as an antigen. *Journal of Virological Methods*, 146, 281–287.
- Parrish, C.R., O'Connell, P.H., Evermann, J.F., Carmichael, L.E. (1985). Natural variation of canine parvovirus. *Science*, 230, 1046-1048.
- Parrish C.R., Have P., Foreyt W.J., Evermann J.F., Senda M., Carmichael L.E. (1988). The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *Journal of General Virology*, 69, 1111–1116.
- Parrish, C.R., Aquadro, C.F., Strassheim, M.L., Evermann, J.F., Sgro, J.-Y., Mohammed, H.O. (1991). Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *Journal of Virology*, 65, 6544-6552.
- Parrish, C. R. (1999). Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, 69(1-2), 29-40.
- Patel, J.R. & Heldens, J.G. (2009). Review of companion animal viral diseases and immunoprophylaxis. *Vaccine*, 27(4), 491-504.
- Pérez, R., Francia, L., Romero, V., Maya, V., Lopez, I., Hernandez, M. (2007). First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Veterinary Microbiology*, 124, 147–152.
- Pinto, L.D., Streck, A.F., Gonçalves, K.R., Souza, C.K., Corbellini, A.O., Corbellini, L.G., Canal C.W. (2012). Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Research*, 165, 39-33.
- Prager, K. C., Mazet, J., Munson, L., Cleaveland, S., Donnelly, C.A., Dubovi, E. J., Gunther, M. S., Lines, R., Mills. G., Davies-Mostert, H. T., McNutt J. W., Rasmussen, G., Terio, K., Woodroffe, R. (2012). The effect of protected areas on pathogen exposure in endangered African wild dog (*Lycaon pictus*) populations. *Biological Conservation*, 150, 15–22.
- Pratelli, A., Buonavoglia, D., Martella, V., Tempesta, M., Lavazza, A., Buonavoglia, C. (2000). Diagnosis of canine coronavirus infection using nested-PCR. *Journal of Virological Methods*, 84, 91–94.
- Pratelli, A., Cavalli, A., Martella, V., Tempesta, M., Decaro, N., Carmichael, L.E., Buonavoglia, C. (2001a). Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8, 612–615.
- Pratelli, A., Martella, V., Elia, G., Decaro, N., Aliberti, A., Buonavoglia, D., Tempesta, M., Buonavoglia, C. (2001b). Variation of the sequence in the gene encoding for
-

transmembrane protein M of canine coronavirus (CCV). *Molecular and Cellular Probes*, 15, 229–233.

- Pratelli, A., Martella, V., Pistello, M. et al. (2003a). Identification of coronaviruses in dogs that segregate separately from the canine coronavirus genotype. *Journal of Virological Methods*, 107(2), 213-222.
- Pratelli, A., Martella V., Decaro N. et al. (2003b). Genetic diversity of a canine coronavirus detected in pups with diarrhoea in Italy. *Journal of Virological Methods*, 110(1), 9–17.
- Pratelli, A., Decaro, N., Tinelli, A., Elia, G., Tempesta, M., Cirone, F., Buonavoglia, C. (2004a). Two genotypes of canine coronavirus simultaneously detected in the fecal samples of dogs with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1797–1799.
- Pratelli, A., Elia, G., Decaro, N., Tola, S., Tinelli, A., Martella, V., Rocca, S., Tempesta, M., Buonavoglia, C. (2004b). Cloning and expression of two fragments of the S gene of canine coronavirus type I. *Journal of Virological Methods*, 117, 61–65.
- Pratelli, A. (2006). Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis. *Veterinary Research*, 37(2), 191–200.
- Pratelli, A. (2008). Canine coronavirus inactivation with physical and chemical agents. *The Veterinary Journal*, 177, 71-79.
- Qiu, W., Zheng, Y., Zhang, S., Fan, Q., Liu, H., Zhang, F., Wang, W., Liao, G. & Hu, R. (2011). Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China. *Emerging Infectious Diseases*, 17(8), 1541-1543.
- Reed, A. P., Jones, E. V., & Miller, T. J. (1988). Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *Journal of Virology*, 62(1), 266–276.
- Roelke-Parker, M.E., Munson, L., Packer, C., Kock, R., Cleaveland, S., Carpenter, M., Obrien, S.J., Pospischil, A., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., Mwamengele, G.L.M., Mgasa, M.N., Machange, G.A., Summers, B.A., Appel, M.J.G., 1996. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*, 379, 441–445.
- Saito, T., Alfieri, A., Wosiacki, S., Negrao, F., Morais, H., & Alfieri, A. (2006). Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Research in Veterinary Science*, 80(1), 116-119.
- Santos, N., Almendra, C., & Tavares, L. (2009). Serologic Survey for Canine Distemper Virus and Canine Parvovirus in Free-ranging Wild Carnivores from Portugal. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(1), 221-226.
- Shackelton, L. A., Parrish, C. R., Truyen, U., & Holmes, E. C. (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(2), 379-384
- Shin, Y., Mori, T., Okita, M., Gemma, T., Kai, C., & Mikami, T. (1995). Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 57(3), 439-445.

-
- Schultz, R.D., Thiel, B., Mukhtar, E., Sharp, P., Larson, L.J. (2010). Age and long-term protective immunity in dogs and cats. *Journal of Comparative Pathology*, 142, S102–S108.
- Schulz, B.S., Strauch, C., Mueller, R.S., Eichhorn, W., Hartmann, K. (2008). Comparison of the prevalence of enteric viruses in healthy dogs and those with acute haemorrhagic diarrhoea by electron microscopy. *Journal of Small Animal Practice*, 49, 84–88.
- Siedek, E.M., Schmidt, H., Sture, G.H., Raue, R. (2011). Vaccination with canine parvovirus type 2 (CPV-2) protects against challenge with virulent CPV-2b and CPV-2c. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 124, 58–64.
- Sobrinho, R., Arnal, M., Luco, D., & Gortazar, C. (2008). Prevalence of antibodies against canine distemper virus and canine parvovirus among foxes and wolves from Spain. *Veterinary Microbiology*, 126(1-3), 251-256.
- Soma, T., Ohinata, T., Ishii, H., Takahashi, T., Taharaguchi, S., Hara, M. (2011). Detection and genotyping of canine coronavirus RNA in diarrheic dogs in Japan. *Research in Veterinary Science*, 90, 205-207.
- Spibey, N., Greenwood, N.M., Sutton, D., Chalmers, W.S., Tarpey, I. (2008). Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Veterinary Microbiology*, 128, 48–55.
- Stavisky, J., Pinchbeck, G.L., German, A.J., Dawson, S., Gaskell, R.M., Ryvar, R., Radford, A.D. (2010). Prevalence of canine enteric coronavirus in a cross-sectional survey of dogs presenting at veterinary practices. *Veterinary Microbiology*, 140, 18-24.
- Stavisky, J., Pinchbeck, G., Gaskell, R.M., Dawson, S., German, A.J., Radford, A.D. (2012). Cross sectional and longitudinal surveys of canine enteric coronavirus infection in kennelled dogs: A molecular marker for biosecurity. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(7), 1419-1426.
- Streck, A.F., Souza, C.K., Gonçalves, K.R., Zang, L., Pinto, L.D., Canal, C.W. (2009). First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 465–469.
- Strothmann, D. M., Scortegagna, G., Kreutz, L. C., Barcellos, L., Frandoloso, R., Anziliero, D. (2008). Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovírus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, 38(2), 400-405
- Sun, Z., Li, A., Ye, H., Shi, Y., Hu, Z., Zeng, L. (2010). Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China. *Veterinary Microbiology*, 141, 374–378.
- Tattersall, P., Bergoin, M., Bloom, M.E., Brown, K.E., Linden, R.M., Muzyczka, N., Parrish, C.R., Tijssen, P., (2005). Family Parvoviridae. In Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press.
- Tennant, B. J., Gaskell, R. M., Jones, R. C., & Gaskell, C. J. (1993). Studies on the epizootiology of canine coronavirus. *The Veterinary Record*, 132(1), 7-11.
- Timm, S. F., Munson, L., Summers, B. A., Terio, K. A., Dubovi, E. J., Rupprecht, C. E., et al. (2009). A suspected canine distemper epidemic as the cause of a catastrophic
-

decline in Santa Catalina Island foxes (*Urocyon littoralis catalinae*). *Journal of Wildlife Diseases*, 45(2), 333-343.

- Tizard, I., Ni, Y. (1998). Use of serologic testing to assess immune status in companion animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 213, 54–60.
- Touihri, L., Bouzid, I., Daoud, R., Desario, C., El Goulli, A.F., Decaro, N., Ghorbel, A., Buonavoglia, C., Bahloul, C. (2009). Molecular characterization of canine parvovirus-2 variants circulating in dogs in Tunisia. *Virus Genes*, 38, 249–258.
- Truyen, U., Gruenberg, A., Chang, S., Obermaier, B., Veijalainen, P., & Parrish, C. (1995). Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *Journal of Virology*, 69(8), 4702-4710.
- Truyen, U., Muller, T., Heidrich, R., Tackmann, K., & Carmichael, L. E. (1998). Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. *Epidemiology and Infection*, 121(2), 433-440.
- Truyen, U. (1999). Emergence and recent evolution of canine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, 69(1-2), 47-50.
- Twark, L., Dodds, W.J. (2000). Clinical use of serum parvovirus and distemper virus antibody titers for determining revaccination strategies in healthy dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217(7), 1021-1024.
- VanGuilder, H.D., Vrana, K.E., Freeman, W.M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44, 619-626.
- Vennema, H., Godeke, G. J., Rossen, J. W., Voorhout, W. F., Horzinek, M. C., Opstelten, D. J., et al. (1996). Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *The EMBO Journal*, 15(8), 2020–2028.
- Vieira, M.J., Silva, E., Oliveira, J., Vieira, A.L., Decaro, N., Desario, C., Muller, A., Carvalheira, J., Buonavoglia, C., Thompson, G. (2008). Canine parvovirus 2c infection in central Portugal. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 488-491.
- Visser, I.K.G., Kumarev, V.P., Örvell, C., De Vries, P., Broders, H.W.J., Van De Bildt, M.W.G., Groen, J., Teppema, J.S., Burger, M.C., Uytdehaag, F.G.M.C., Osterhaus, A.D.M.E. (1990). Comparison of two morbilliviruses isolated from seals during outbreaks of distemper in North West Europe and Siberia. *Archives of Virology*, 111, 149–164.
- von Messling, V., Zimmer, G., Herrler, G., Haas, L., Cattaneo, R. (2001). The haemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *Journal of Virology*, 75, 6418–6427.
- von Messling, V., Svitek, N., Cattaneo, R. (2006). Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *Journal of Virology*, 80, 6084–6092.
- Woma, T.Y., van Vuuren, M., Bosman, A.M., Quan, M., Oosthuizen, M. (2010). Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. *Veterinary Microbiology*, 143, 126-132.

-
- Yang, D., Yoon, S., Byun, J., Lee, K., Oh, Y & Song, J. (2010). Serological Survey for Canine Parvovirus Type 2a (CPV-2a) in the Stray Dogs in South Korea. *Journal of Bacteriology and Virology*, 40(2), 77 – 81.
- Zarnke, R., Evermann, J., Ver Hoef, J., McNay, M., Boertje, R., Gardner, C., et al. (2001). Serologic survey for canine coronavirus in wolves from Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(4), 740-745.
- Zeng, Q., Langereis, M. A., van Vliet, A. L. W., Huizinga, E. G., De Groot R. J. (2008). Structure of coronavirus hemagglutininesterase offers insight into corona and influenza virus evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(26), 9065–9069.
- Zhao, J.J., Yan, X.J., Chai, X.L., Martella, V., Luo, G.L., Zhang, H.L., Gao, H., Liu, Y.X., Bai, X., Zhang, L., Chen, T., Xu, L., Zhao, C.F., Wang, F.X., Shao, X.Q., Wu, W., Cheng, S.P. (2010). Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from breeding foxes, raccoon dogs and minks in China. *Veterinary Microbiology*, 140, 34–42.